

00528
91

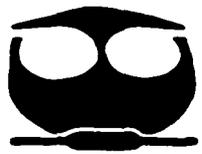


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**"DETERMINACION DE FRUCTOOLIGOSACARIDOS CON
POTENCIAL PREBIOTICO EN AGUAMIEL".**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
OMAR / VICTORIA ACOSTA



MEXICO, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Raúl Aguilar Caballero
VOCAL: Francisca Iturbe Chinas
SECRETARIO: Alma Elizabeth Cruz Guerrero
PRIMER SUPLENTE: Bertha Julieta Sandoval Guillén
SEGUNDO SUPLENTE: María Teresa Plata Jiménez

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

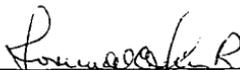
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Planta Piloto 2.

ASESOR:



M. en C. Alma E. Cruz Guerrero

SUPERVISOR TÉCNICO:



M. en C. Lorena Gómez Ruíz

SUSTENTANTE



Omar Victoria Acosta

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE:

Omar Victoria Acosta

FECHA: 30/sep/2003

FIRMA:



2

Con dedicatoria:

A mi familia, que son lo más importante en mi vida

*Con amor para mis padres, gracias a ustedes soy la que ven ahora,
espero se sientan tan orgullosos de mi como yo lo estoy de ustedes.
No hay palabras que expresen toda la gratitud y amor que los tengo.*

A Gina y Dibi, gracias por soportarme.

A la memoria de mi tía María

AGRADECIMIENTOS

Aunque para muchos que me conozcan sea una sorpresa, gracias Dios.

A ti cosa, porque en su momento fuiste mi fuente de fortaleza y después de mi familia lo más grande en mi vida.

A quienes considero mis hermanos, Alfonso, Yesid y Alonso, por su amistad y su apoyo incondicional. Espero que siempre sigamos siendo finísimos.

A Alma, por ser mi asocora, mi guía y mi amiga.

A Paola, por su cariño, comprensión y hacerme más placentera la estancia en ese lugar al que llamamos Betty Ford Center.

A Susana, Mariosa, Judith y Angélica, gracias por creer en mí.

A Itzamna, por su apoyo en esos momentos en que la vida parece atropellarnos.

A la maestra Lorena y el doctor Mariano, por haberme acogido en su equipo, tenerme en tan buen concepto y hacerme de tan buena fama.

A todos aquellos que han pasado por mi vida, dejando una marca en ella, ya sea que fueran amigos o detractores, personas como Carolina, Jacqueline, Marcia, Erika, Blanca, Marcela, Aith, Pamela, Lucila, la Dra. Martha Pérez, César, Luis Antonio, Alfredo, Luis Guillermo, Christian, Arturo y Héctor.

ÍNDICE

1. Introducción	3
2. Resumen	4
3. Objetivos	5
4. Antecedentes	6
4.1. Agaves y aguamiel	6
4.2. Prebióticos	7
4.2.1. Tipos de oligosacáridos	9
4.2.2. Volúmenes de producción de oligosacáridos	12
4.2.3. Desarrollo tecnológico en probióticos y prebióticos	14
4.3. Fructooligosacáridos	14
4.3.1. Síntesis de FOS usando sacarosa como sustrato	15
4.3.2. Síntesis de FOS usando inulina como sustrato	15
4.3.3. Beneficios del consumo de FOS	16
4.3.4. Aplicaciones de los FOS	17
5. Metodología	19
5.1. Recolecta y tratamiento del aguamiel	19
5.2. Acondicionamiento del aguamiel	19
5.3. Cuantificación de FOS	19
5.3.1. Condiciones del equipo	20
5.3.2. Patrones para análisis cromatográfico	20
5.3.2.1. Determinación de tiempos de retención (TR) y respuesta de los patrones comerciales	20
5.3.2.2. Elaboración de curvas de referencia de patrones comerciales	21
5.3.2.3. Elaboración de patrones para los FOS de 3 a 9 unidades	21
5.3.2.3.1. Aislamiento de los componentes de la inulina HD	21
5.3.2.3.2. Verificación del aislamiento	21
5.3.2.3.3. Identificación de los componentes aislados	22
5.3.2.4. Determinación de los tiempos de retención para toda la gama posible de FOS	22
5.3.2.5. Elaboración de curvas de referencia de patrones para los FOS de 3 a 9 unidades	22
5.3.2.6. Análisis de cromatogramas	22
5.3.2.6.1. Determinación del grado de polimerización	23
6. Resultados y discusión	24
6.1. Muestras de aguamiel	24
6.2. Selección de la muestra para desproteínizar los aguamiel	24
6.3. Patrones comerciales para análisis cromatográfico	28

6.3.1. Determinación de los TR y repuesta para los patrones comerciales	28
6.3.2. Elaboración de las curvas de referencia de los patrones comerciales	30
6.3.3. Patrones comerciales para los FOS de 3 a 9 unidades	31
6.3.4. Elaboración de curvas de referencia para FOS de 3 a 9 unidades	37
6.4. Análisis de aguamieles	38
7. Conclusiones	48
8. Bibliografía	49
9. Anexo	52

1. INTRODUCCIÓN

El aguamiel es un jugo que se extrae del agave pulquero (*Agave atrovirens*), en esta planta la inulina es el polisacárido de reserva, por lo tanto de forma natural el aguamiel presenta derivados de ésta, a los cuales se les conoce con el nombre de fructooligosacáridos (FOS). Estos oligosacáridos están formados por cadenas de 2 a 10 unidades de fructosa, o bien pueden presentar una unidad terminal de glucosa. Se ha encontrado que estos compuestos tienen potencial prebiótico, esto quiere decir, que estimulan el crecimiento selectivo de bacterias probióticas en el colon del consumidor. Esta selectividad es importante para la salud debido a que el colon es la parte del intestino donde se tiene la mayor actividad tanto fisiológica como endocrinológica.

Debe aclararse que este potencial prebiótico no es exclusivo de los fructooligosacáridos, ya que este efecto se les atribuye a la mayoría de los oligosacáridos no digeribles (OND), pero en varias investigaciones se ha comprobado que los FOS presentan mayor efectividad con respecto a los otros oligosacáridos que se comercializan en el mercado internacional.

En el presente trabajo el principal objetivo fue caracterizar los FOS (grados de polimerización y concentración) presentes en diferentes muestras de aguamiel de distintas zonas productoras del país (Miipa Alta, D. F.; Coatepec, Estado de México).

2. RESUMEN

El aguamiel es un jugo que se extrae principalmente del agave manso (*Agave atrovirens Karw*). En éstas plantas el principal polisacárido de reserva es la inulina, el cual es una cadena lineal de hasta 59 unidades de fructosa y una unidad terminal de glucosa. Por tal motivo al hidrolizarse la inulina por la acción de enzimas nativas y de algunos otros microorganismos (levaduras principalmente); se pueden encontrar diversos tipos de fructooligosacáridos (FOS) en el aguamiel, y por esta misma acción enzimática se pueden identificar cadenas que están compuestas únicamente de fructosa (FOS') o bien que contienen la unidad terminal de glucosa (FOS).

Para ser considerados fructooligosacáridos deben ser cadenas con un grado de polimerización de 2 a 10 unidades.

El análisis de los aguamiel se llevó a cabo usando la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés); para la determinación de estos componentes fue necesario:

1. Seleccionar el método adecuado para eliminar la proteína presente en la muestra.
2. Determinar los tiempos de retención (TR) para algunos patrones comerciales.
3. Elaborar curvas de referencia de concentración en función del área obtenida en la señal que proporcionan cada uno de los patrones comerciales.
4. Como en el mercado actual no existe un patrón para cada uno de los FOS, fue necesario establecer una técnica que nos permita obtener éstos patrones.
5. Una vez que se obtuvieron experimentalmente los tiempos de retención para algunos fructooligosacáridos, se calculó el resto de los TR para toda la gama posible de FOS y FOS'.
6. Se estableció una metodología para calcular las concentraciones de todos los componentes de los aguamiel.

Al tener todas estas herramientas se pudieron analizar los cromatogramas de los aguamiel y se encontró que el componente mayoritario en todos los aguamiel es la sacarosa, seguido de la glucosa y fructosa. En cuanto al contenido de fructooligosacáridos se observó que los mas comunes son los de 10, 7, 5, 5', 4', 3, 3' y 2', este último corresponde al disacárido fructosa-fructosa; siendo los FOS de 9', 8, 6, 6' y 4 los que se encuentran en un menor número de muestras. Estos resultados nos hacen ver que la variedad de FOS que se puede encontrar depende de la procedencia de la muestra.

Las muestras presentaron un rango de 2 a 10 g/L de FOS totales, siendo 6 g/L el valor mas común, aunque se encontró una muestra sobresaliente, que presentó un contenido total de FOS de 21 g/L.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los aguamieles a fin de determinar el grado de polimerización y concentración de los oligofruktanos que de forma natural se encuentran en éstos.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- 3.2.1. Seleccionar una técnica para desproteínizar los aguamieles sin afectar la composición en función de los azúcares presentes.
- 3.2.2. Establecer la metodología a seguir para lograr una separación apropiada en HPLC de los patrones comerciales de oligofruktanos y azúcares empleados.
- 3.2.3. Determinar la técnica a seguir para lograr contar con los patrones necesarios para cuantificar los FOS presentes en las muestras de aguamiel.
- 3.2.4. Determinar la relación grado de polimerización-tiempo de retención que existe.
- 3.2.5. Determinar si las muestras de aguamiel representan una fuente de prebióticos.

4. ANTECEDENTES

4.1. AGAVES Y AGUAMIEL

Entre las plantas de uso integral que se cultivan en México desde la época prehispánica, se encuentra el maguey o agave, metl en náhuatl. Existen diferentes variedades de agaves que producen aguamiel, entre ellas destaca el maguey manso, que es el que más abunda en nuestro país, cuyo nombre científico es *Agave atrovirens Karw* (ver clasificación botánica en tabla 4.1.). El aguamiel es un jugo que se extrae del centro de la planta, que también es llamado meyolote, y desde antes de la colonia servía para elaborar miel, vinagre y bebidas fermentadas como el pulque.

Tabla 4.1. Clasificación botánica del *Agave atrovirens Karw*

Reino:	Vegetal
Subreino:	fanerógamas
Tipo:	angiospermas
Clase:	monocotiledóneas
Familia:	amarilidáceas
Genero:	Agave
Especie:	atrovirens

Para que una planta sea productora de aguamiel, requiere de 10 a 12 años de crecimiento. Con gran sentido de observación los campesinos reconocen el momento previo al surgimiento de la flor, la señal más clara de esto es cuando el *cogollo* (hojas de la planta central de la planta) se adelgaza, a la vez que sus hojas exteriores pierden las espinas de sus bordes en su parte inferior y forman una línea continua llamada "hilo", las pencas exteriores se ven más cercanas al centro de la planta y sus extremos se doblan ligeramente hacia este; simultáneamente las púas terminales se hacen más agudas y toman una coloración más oscura, especialmente en la punta del *cogollo*. La castración se lleva a cabo cortando el tallo floral, de ahí que se forma una cavidad en el meyolote. Si el maguey es castrado al presentar estas características se dice que se castró "al hilo", cuando la castración se lleva a cabo antes, se dice que se capo "gordo".

Una vez que se castró al maguey, es necesario dejar añejarlo, con el propósito de que el tallo de la planta (o *mezontete*) alcancen su máximo desarrollo, y el aguamiel presente un máximo contenido de azúcares. Este añejamiento puede ser de 6 a 12 meses, dependiendo de las características del agave, el suelo, el clima y de si fue castrado a tiempo o prematuramente.

Cuando ha pasado el tiempo de maduración se puede empezar la "raspa", que consiste en raspar las paredes del meyolote (con lo cual se va ensanchando), para que así se libere la supuración de la planta, que es el aguamiel. El aguamiel se acumula en la parte baja de la cavidad, se extrae dos veces al día y en ese

momento llegan a producirse hasta seis litros al día. El período que permanece en producción es de 3 a 6 meses. La extracción tradicional se realiza succionando el jugo con un guaje largo llamado acocote, que funciona como una pipeta (Barros y Buenrostro, 1997a y 1997b; Martínez del Campo, 1999).

Las cualidades nutritivas del aguamiel son ampliamente reconocidas pues provee vitaminas C, D, E y derivados del complejo B, y de carbohidratos (Barros y Buenrostro, 1997a).

Existen pocos estudios sobre la composición exacta del aguamiel, quizá el más antiguo es el de Sánchez y Hope (1953), donde reporta que este jugo contiene un polisacárido de fructosa llamado inulina, y otros azúcares fermentables, predominando la fructosa. Más recientemente Martínez del Campo (1999) encontró que el aguamiel contiene de forma natural fructosa, glucosa y sacarosa libres, así como cadenas de fructosa con diferente grado de polimerización y en algunos casos hasta inulina, lo cual es razonable ya que es sabido que los agaves contienen este polisacárido en distintas partes de la planta (Srinivasan y Bhatia, 1953).

4.2. PREBIÓTICOS

En los últimos años la finalidad de la alimentación esta cambiando. Antes se consideraba que solo era esencial alimentarse para la sobrevivencia y la satisfacción del hambre, buscando en los alimentos la ausencia de efectos adversos en el organismo y el mantenimiento de la salud. Hoy en día se ha ampliado el concepto relacionándolo con la promoción de la salud y el bienestar así como también con la reducción del riesgo de enfermedades crónicas, relacionadas con la alimentación (enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, la obesidad, etc.).

Esta nueva filosofía de vida es especialmente importante en la sociedad actual en la cual las principales características a destacar son las siguientes:

- El continuo aumento en la esperanza de vida.
- El incremento en el costo del cuidado de la salud.
- El perfeccionamiento constante de la tecnología de la industria agroalimentaria.
- La búsqueda de una mejora en la calidad de vida.

Por esta razón, cada día tienen más importancia los denominados nutraceuticos o alimentos funcionales, los cuales pueden definirse como una nueva gama de alimentos naturales o procesados que, incluidos en las dietas del ser humano, favorecen el bienestar físico y mental de las personas (Rivero, 2000).

Dentro de los alimentos funcionales relacionados con la mejora de la respuesta de la función inmune, destacan los ingredientes prebióticos y probióticos.

La denominación de alimentos funcionales es algo que se dio en los últimos años, pero el estudio del beneficio que aportaba el consumo de ciertos alimentos se empezó a dar con Elie Metchnikoff en 1907, él realizó lo que se puede

considerar como el primer estudio sobre la relación entre la flora intestinal y la salud humana, proponiendo en su "Teoría de la longevidad sin envejecimiento", la hipótesis de que la longevidad que presentaban algunos campesinos búlgaros y de otras zonas mediterráneas de Europa del Este, era consecuencia del consumo regular de yogurt como parte de su dieta diaria. Con esto se puede afirmar que con Metchnikoff se da la primera idea de probiótico, pero el término es usado por primera vez en 1964 por Lilly y Stillwell para describir a sustancias producidas por un microorganismo que estimula el crecimiento de otro, esto es, una función opuesta a los antibióticos. La palabra fue aplicada posteriormente para referirse a extractos de tejidos que estimulaban el crecimiento bacteriano (Sperti, 1971) sin embargo, Parker (1974) fue el primero en usar el término probiótico de acuerdo al sentido que hoy conocemos, es decir organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano en el intestino (Escalante, 2001; Schrezenmeir y de Vrese, 2001, Gibson y Fuller, 2000, Fooks y col., 1999).

En 1989 Fuller redefine el concepto de probiótico como *un suplemento de organismos vivos los cuales benefician al huésped animal mejorando su balance microbiano intestinal*. Esta definición enfatiza el requerimiento de viabilidad para los probióticos e introduce el aspecto benéfico para el huésped animal. En 1992 Havenaar y col. aclaran el término respecto al huésped y el hábitat de la microflora, mencionándolo como un mono cultivo o cultivo mixto viable de microorganismos, los cuales aplicados a un animal o al hombre afectan benéficamente al huésped por el mejoramiento de las propiedades de la microflora endógena (Escalante, 2001; Schrezenmeir y de Vrese, 2001, Brady y col., 2000; Fuller, 1989)

Al analizar estas últimas definiciones se puede ver que han quedado fuera de ellas las "sustancias" que ayudan al balance microbiano, por tal razón, había que englobar a éstas en otra palabra, esto lo hacen Gibson y Roberfroid (1995) al introducir el término de prebióticos para definir a los "ingredientes alimenticios no digeribles que afectan benéficamente al huésped por la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un grupo limitado de bacterias en el colon, mejorando así la salud del huésped" (Schrezenmeir y de Vrese, 2001; Brady y col., 2000; Fuller, 1989).

Esto es de suma importancia para la salud ya que es el colon la parte del intestino grueso donde se tiene la mayor actividad tanto fisiológica como endocrinológica (Fooks y col., 1999).

En la actualidad los principales prebióticos son oligosacáridos, industrialmente 12 diferentes tipos son los de mayor importancia, cabe destacar que la mayoría de ellos no son digeribles por las enzimas del ser humano, por lo que no son absorbidos en el intestino delgado y llegan íntegros hasta el colon, donde estimulan el crecimiento de la flora intestinal deseable. Se hace una descripción de estos oligosacáridos a continuación (Crittenden y Playne, 1996; Gibson y Fuller, 2000).

4.2.1. Tipos de oligosacáridos

Los oligosacáridos son componentes naturales de muchos alimentos, como frutas, vegetales, leche y miel. Para ser considerados oligosacáridos la International Union of Pure and Applied Chemistry y la International Union of Biochemistry consideran que debe ser una cadena de azúcares con grado de polimerización de 2 a 10 unidades (Van Loo y col., 1999). Principalmente en Japón y algunos países de Europa estos compuestos adquirieron durante la década de los noventa del siglo pasado una gran popularidad debido a sus propiedades funcionales en la industria de alimentos y por ser reconocidos como prebióticos. Por tal motivo hoy en día se producen industrialmente 12 clases de oligosacáridos (Crittenden y Playne, 1996; Yun J. W., 1996). A continuación se enlistan 11 de ellos, con una breve descripción de la forma en que son sintetizados. Se deja para la siguiente sección la descripción de los fructooligosacáridos para profundizar un poco más en estos oligosacáridos que fueron el objeto de estudio en este trabajo.

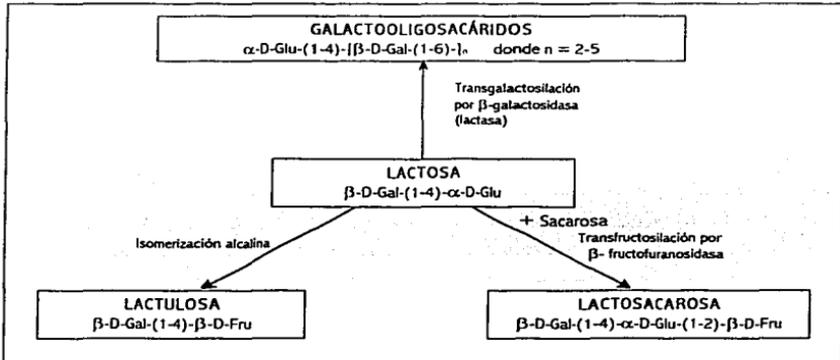


Fig. 4.1. Oligosacáridos manufacturados a partir de lactosa (Gal = galactosa; Glu = glucosa; Fru = fructosa)

1. Galactooligosacáridos

El establecimiento de la microflora intestinal en un niño que es amamantado es atribuido a la presencia de galactosa contenida en los galactooligosacáridos presentes en la leche humana. Por tal motivo la inclusión de estos oligosacáridos ha atraído considerablemente el interés comercial. Son producidos comercialmente a partir de la lactosa (Fig. 4.1.) usando la actividad de galactosiltransferasa de la

β -galactosidasa (EC 3.2.1.23). La producción de galactooligosacáridos se garantiza al haber un exceso de lactosa en el medio de reacción.

2. Lactulosa

Aunque en este caso es un disacárido, se le considera prebiótico porque es un azúcar que no es digerible por los humanos. Al igual que los GOS son producidos a partir de la lactosa (Fig. 4.1.), esto se hace por medio de una isomerización alcalina, para así convertir la glucosa en fructosa. Actualmente es usada predominantemente en la industria farmacéutica para el control de constipación y encefalopatía portosistémica.

3. Lactosacarosa

Este es el tercer oligosacárido bifidogénico que se produce a partir de la lactosa (Fig. 4.1. y 4.2.). Este trisacárido se sintetiza uniendo un residuo de fructosa a la glucosa de la lactosa en posición $\beta(2-1)$. Se manufactura a partir de una mezcla de lactosa y sacarosa, aprovechando la actividad de transesterificación de la enzima β -fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26).

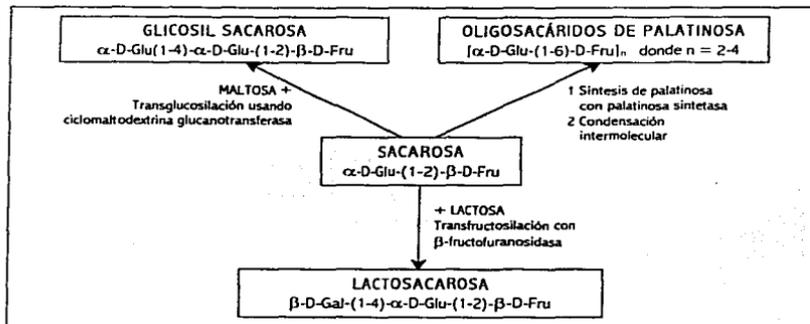


Fig. 4.2. Oligosacáridos manufacturados a partir de sacarosa (Gal = galactosa; Glu = glucosa; Fru = fructosa)

4. Oligosacáridos de palatinosa (isomaltulosa)

Estos oligosacáridos de palatinosa (como se llama comúnmente a la isomaltulosa) son producidos a partir de la sacarosa, para esto se emplea a la enzima isomaltulosa sintetasa (EC 5.4.99.11) (Fig. 4.2.). Tiene acción prebiótica siempre y cuando se le deshidrate intermolecularmente.

5. Glicosil sacarosa

Este trisacárido es sintetizado enzimáticamente (Fig. 4.2.) por la ciclomaltodextrina glucanotransferasa (EC 2.4.1.19) a partir de sacarosa y maltosa. Este azúcar es susceptible de hidrólisis por las enzimas intestinales, así que su respuesta bifidogénica por el consumo de ésta es poco probable.

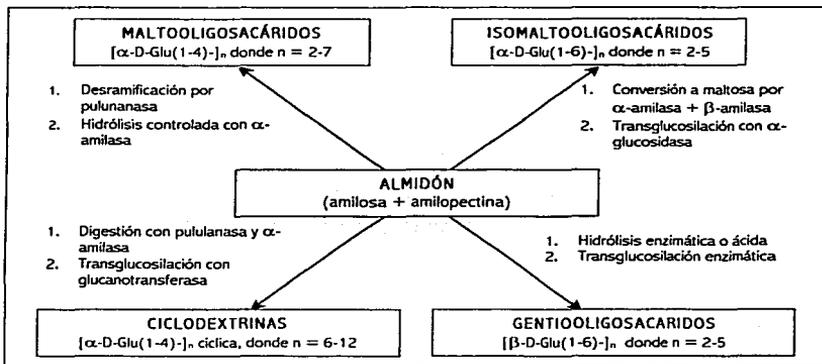


Fig. 4.3. Oligosacáridos manufacturados a partir de almidón (Glu = glucosa). Isomaltooligosacáridos pueden contener algunos enlaces $\alpha(1-4)$

6. Maltooligosacáridos

Estos oligosacáridos están formados por residuos de glucosa unidos en $\alpha(1-4)$. Industrialmente se sintetizan usando las enzimas pululanasa (EC 3.2.1.41) e isoamilasa (EC 3.2.1.68) y el almidón como sustrato (Fig. 4.3.) obteniéndose oligosacáridos con un grado de polimerización de 2 a 7. Dado que son hidrolizables y absorbidos en el intestino delgado, no se reconoce que estos oligosacáridos incrementen el número de bifidobacterias en el colon, pero se ha demostrado en algunas investigaciones que el consumo de maltooligosacáridos con grado de polimerización de 4 reduce el número de enterobacterias en el colon.

7. Isomaltooligosacáridos

Estos oligosacáridos sí estimulan el crecimiento de las bifidobacterias. Están constituidos por 2 a 5 α -D-glucosas unidas por enlaces glicosídicos $\alpha(1-4)$. Se sintetizan en 2 etapas (Fig. 4.3.), en la primera el almidón sirve de sustrato para la α -amilasa (EC 3.2.1.1). En la segunda actúan las enzimas β -amilasa (EC 3.2.1.2) y

α -glucosidasa (EC 3.2.1.20, que tiene actividad de transglucosidasa) las cuales producen maltosa y los isomaltooligosacáridos respectivamente.

8. Ciclodextrinas

Son maltooligosacáridos cíclicos, que presentan uniones $\alpha(1-4)$, constituidos por 6-12 unidades de glucosa. Son sintetizados por la digestión con la ciclomaltodextrina glucoanotransferasa (Fig. 4.3.) del almidón. Generalmente se le considera como bifidogénico.

9. Gentioligosacáridos

Los gentioligosacáridos están constituidos por algunos residuos de glucosa unidos por enlaces $\beta(1-6)$. Son producidos por transglucosilación enzimática de un jarabe de glucosa (Fig. 4.3.). Estos oligosacáridos estimulan el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos.

10. Oligosacáridos de soya

Al contrario de los casos anteriores, estos no se sintetizan enzimáticamente, si no que se extraen directamente de la soya y se concentran en jarabes que contienen una mezcla de rafinosa, estaquiosa, sacarosa, glucosa y fructosa. Rafinosa y estaquiosa son indigeribles por el intestino delgado, por lo que llegan al colon intactos y ahí tienen actividad prebiótica.

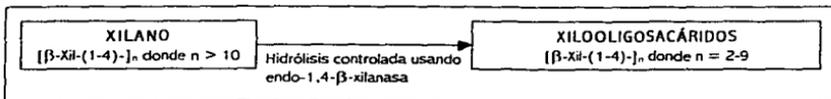


Fig. 4.4. Oligosacáridos manufacturados a partir de xilano (Xil = xilosa).

11. Xilooligosacáridos

Son producidos por la acción controlada de la enzima endo-1,4-β-xilanasas (EC 3.2.1.8) sobre el polisacárido xilano (que es extraído principalmente de las mazorcas de maíz). Este producto se emplea primordialmente en bebidas con potencial prebiótico.

4.2.2. Volúmenes de producción de oligosacáridos

En la tabla 4.2. se muestran que empresas y en que volumen producen los 12 oligosacáridos mencionados anteriormente, es de destacar que los datos más recientes que se pueden encontrar en la literatura datan de 1995. Se puede observar que, como se señaló con anterioridad, los principales productores son empresas de países Europeos y Japón. En el caso de la lactulosa, algunas empresas no la venden con algún nombre comercial.

Tabla 4.2. Producción de oligosacáridos en 1995 (Crittenden y Playne, 1996).

Galactooligosacáridos	15 000	Yakult Honsha (Japón)	Oligomate
		Nissin Sugar Manufacturing Company (Japón)	Cup-Oligo
		Snow Brand Milk Products (Japón)	P7L y otros
		Borculo Whey Products (Holanda)	TOS-Syrup
Lactulosa	20 000	Morinaga Milk Industry Co. (Japón)	MLS/P/C
		Solvay (Alemania)	Lactulosa
		Milei GMBH (Alemania)	Lactulosa
		Canlac Corporation (Canadá)	Lactulosa
		Laevosun (Australia)	Lactulosa
Lactosacarosa	1 600	Inalco (Italia)	Lactulosa
		Ensuiko Sugar Refining Co. (Japón)	Nyuka-Oligo
Fructooligosacáridos	12 000	Hayashibara Shoji Inc. (Japón)	Newka-Oligo
		Meiji Seika Kaisha (Japón)	Meiologo
		Beghin-Meiji Industries (Francia)	Actilight
		Golden Technologies (E.U.A.)	Nutraflora
		Cheil Foods and Chemicals (Corea)	Oligo-Sugar
		Orafti (Bélgica)	Raftilose y Raftiline
Oligosacáridos de palatinosa (isomaltulosa)	5 000	Cosucra (Bélgica)	Fibruline
		Mitsui Sugar Co. (Japón)	ICP/O IOS
Glicosil-sacarosa	4 000	Hayashibara Shoji Inc. (Japón)	Coupling Sugar
Maltooligosacáridos	10 000	Nihon Shokuhin Kako (Japón)	Fuji-Oligo
		Hayashibara Shoji Inc. (Japón)	Tetrap
Isomaltooligosacáridos	11 000	Showa Sangyo (Japón)	Isomalto-900
		Hayashibara Shoji Inc. (Japón)	Panorup
		Nihon Shokuhin Kako (Japón)	Biotose y Panorich
Ciclodextrinas	4 000	Nihon Shokuhin Kako (Japón)	Celdex
		Ensuiko Sugar Refining Co. (Japón)	Dexy Pearl
Gentiooligosacáridos	400	Ashi Kasei Kagyo Co. (Japón)	Gentose
Oligosacáridos de soya	2 000	Nihon Shokuhin Kako (Japón)	
Xilooligosacáridos	300	The Calpis Food Industry Co. (Japón)	Soya-Oligo
		Suntory Ltd (Japón)	Silo-Oligo

4.2.3. Desarrollo tecnológico en probióticos y prebióticos

En la actualidad se busca que la estabilidad y viabilidad de las cepas probióticas que contienen algunos alimentos sea mayor. Por tal motivo se ha estudiado la posibilidad de microencapsular las cepas de bifidobacterias en mezclas de alginato-almidón parcialmente hidrolizado. En este caso el almidón funciona como prebiótico sirviendo de alimento a la bacteria encapsulada. Esto se ha probado principalmente en yogur y se encontró que por este método las bacterias tienen una mayor resistencia al frío (al agregar glicerol durante el encapsamiento) y una mayor supervivencia ya que llevan mas lentamente la producción de ácidos en comparación con las células libres. Sin embargo no se encontró evidencia de que este método ayudara al aumento de la flora intestinal (Sultana y col., 2000).

Recientemente se han realizado trabajos de encapsulación usando solo almidón, ya sea en su forma natural o algunos tratados física o enzimáticamente. La forma más eficiente que se ha encontrado para lograr que un mayor número de microorganismos colonicen el tracto gastrointestinal, es formando microgránulos de almidón (diámetros de 50-100 μm) a los cuales se les trata enzimáticamente para obtener una estructura porosa, en la cual se puede fijar con mayor facilidad los microorganismos probióticos. Pero a su vez la viabilidad de los probióticos en la matriz del alimento depende de factores como la temperatura de almacenamiento, el pH, los niveles de oxígeno y la presencia de microorganismos competidores o inhibidores. Por último cabe señalar que uno de los puntos más importantes que se debe cuidar en este tipo de investigaciones es que la incorporación de estos microgránulos no confieran sabores indeseables en el producto (Mattila-Sandholm y col., 2002).

4.3. FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS

Los fructooligosacáridos (FOS), también conocidos como inulooligosacáridos y fructosanos, son cadenas lineales de fructosa (unidas por enlaces $\beta(1-2)$, que pueden o no presentar 1 unidad terminal de glucosa.

Industrialmente son producidos por dos diferentes procesos enzimáticos: en el primero son sintetizados a partir de sacarosa y en el segundo por hidrólisis de la inulina (Crittenden y Playne, 1996).

La inulina es un polifrutano componente natural de cerca de 36000 plantas alrededor del mundo. Algunas fuentes comunes de este polisacárido son: cebolla, ajo, puerro, plátano, espárrago, dalia, alcachofa de Jerusalén y achicoria, siendo las 3 últimas las más promisorias, ver tabla 2 (Martínez del Campo, 1999; Folleto Frutafit, 1998).

Aunque hoy en día el uso de los FOS este de moda, el dato mas antiguo del aprovechamiento de éstos es el registro del Papiro de Ebers (17 siglos a.C.) cuando los egipcios los utilizaban para controlar la fiebre. Posteriormente los griegos (en el año 100 a.C.) hacían uso de polvo de alcachofa de Jerusalén para que les ayudara en la digestión. En el siglo pasado en Estados Unidos, durante la guerra civil, se usó como extensor de café, intensificándose este uso durante la segunda guerra mundial (Folleto, Frutafit).

Tabla 4.3. Fuentes de inulina

Fuente	% de inulina*
Cebolla	2-6
Ajo	9-16
Puerro	3-10
Plátano	0.3-0.7
Espárrago	10-15
Alcachofa de Jerusalén	15-20
Achicoria	15-20
Dalia	15-20

* Porcentaje en base seca

4.3.1. Síntesis de FOS usando sacarosa como sustrato

Se pueden manufacturar a partir de sacarosa, usando la actividad de transfructosilación de la β -fructofuranosidasa. Para lograr este efecto se necesita una alta concentración inicial de sacarosa. Los oligosacáridos que se producen están unidos mediante enlaces $\beta(1-2)$ y tienen una unidad terminal de glucosa. Por este método se pueden producir cadenas con un grado máximo de polimerización de 5. Este proceso se puede llevar a cabo de 2 diferentes formas: en lotes y en continuo (Fig 4.4). El sistema en continuo consiste en inmovilizar en un gel de alginato, las células o el extracto enzimático (ya sea de *A. Niger* o *A. pullulans*). Se obtiene una mayor estabilidad al atrapar a las células en el gel que al hacer lo mismo con la enzima. La esterilización final se lleva a cabo ya sea por calor o con luz ultravioleta. (Yun, 1996)

Dado que en este método de producción de FOS, se libera glucosa y es esta la que al alcanzar cierta concentración provoca que haya una inhibición de la reacción, Shue y col. (2001) proponen modificaciones para evitar este efecto e incrementar el rendimiento; esto lo logran al transformar la glucosa residual en ácido glucónico con una mezcla comercial de enzimas (glucosa oxidasa y catalasa) y posteriormente se retira del medio de reacción al precipitarlo con CaCO_3 .

4.3.2. Síntesis de FOS usando inulina como sustrato

Esta forma de producción de FOS implica una hidrólisis enzimática controlada de la inulina, usando solo una exo-inulinasa (EC 3.2.1.26; β -D-fructofuranosidasa, la cual hidroliza a partir de los extremos los enlaces fructosa-fructosa) o en cooperación con una endo-inulinasa (EC 3.2.1.7; β -fructano-fructano-hidrolasa, la cual actúa en el interior de la cadena hidrolizando los enlaces entre fructosa y fructosa). La mezcla de FOS obtenida es mas rica en variedad que en el primer método, ya que en la mezcla puede contener fructooligosacáridos con un grado de polimerización de hasta 10 unidades (Crittenden y Playne, 1996; Kim y col., 1997; Folletto Frutafit, 1998).

En busca de un mayor rendimiento en este proceso, algunos investigadores se han dado a la tarea de encontrar enzimas con acción de endoinulinasa que sean

mas resistentes a la inhibición por producto, así como también el encontrar las condiciones óptimas para llevar a cabo la hidrólisis del sustrato. Tal es el caso de lo reportado por Cho y col. (2001) y Kim y col. (1997) para enzimas obtenidas de *Xanthomonas oryzae* y *Pseudomonas sp.* respectivamente.

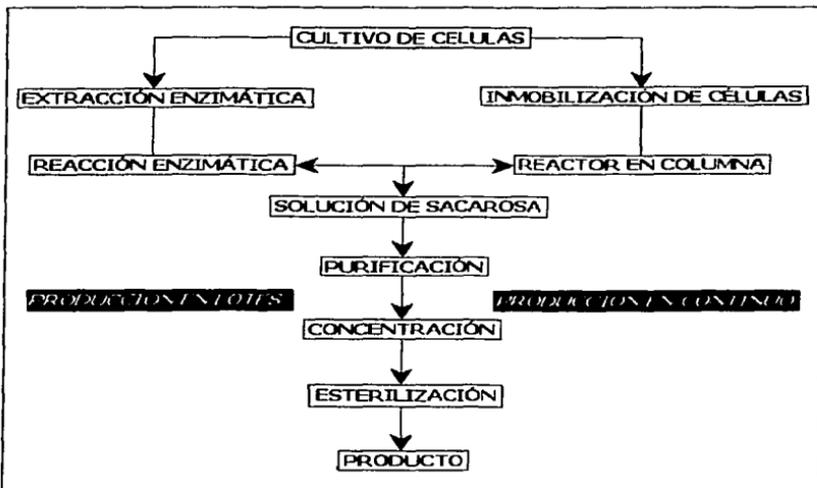


Fig. 4.4. Esquema de la producción de FOS usando sacarosa como sustrato.

4.3.3. Beneficios del consumo de FOS

La influencia que tienen los fructooligosacáridos en el desarrollo de las bifidobacterias es mayor que los otros oligosacáridos no digeribles (OND). Estudios experimentales *in vitro* han demostrado que en el caso de los fructooligosacáridos son metabolizados selectivamente por las bifidobacteria, y que esta fermentación selectiva induce una disminución del pH del medio debido a la producción de grandes cantidades de lactato y acetato que inhiben el crecimiento de *E. coli* y *Clostridium* y otras bacterias patógenas como *Listeria*, *Shigella* o *Salmonella*. (Bielecka y col., 2002; Fooks y Gibson, 2002; Guigoz y col., 2002; Zubillaga y col., 2001). Además de estos efectos, otras propiedades benéficas a la salud son las siguientes:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. Dado que no son digeribles, pero son edulcorantes, pueden ser consumidos por personas diabéticas.
2. Son no cariogénicos. Ya que no pueden ser consumidos por los microorganismos que forman la placa dentobacteriana.
3. Por ser fibra incrementan la motilidad intestinal, con lo que se reduce el tiempo de estancia del bolo fecal en los intestinos.
4. Producción de ácidos grasos de cadena corta, esto ayuda a la prevención del estreñimiento ya que estimula la peristalsis intestinal e incrementa la humedad del bolo fecal debido a la presión osmótica.
5. Se ha observado que ayudan a disminuir los niveles de colesterol, fosfolípidos y triacilglicéridos en sangre, por lo que se reducen los casos de enfermedades cardiovasculares. Algunas cepas de *Lactobacillus acidophilus* asimilan el colesterol presente en el medio, mientras que otras parecen tener un papel inhibitorio de la absorción de las micelas de colesterol a través de la pared intestinal.
6. Aumento de la absorción de diferentes minerales a nivel intestinal, esto ayudado por la disminución del pH, facilitando la absorción de minerales como el hierro y el calcio.
7. Gracias a su fermentación por la flora intestinal disminuyen desórdenes gastrointestinales, tales como las úlceras, diarrea por infecciones y la intolerancia a la lactosa (Guigoz y col. 2002; Fooks y Gibson, 2002; Losada y Olleros, 2002; Zubillaga y col., 2001; Rivero, 2000; Crittenden y Playne, 1996).

Los posibles mecanismos por los que se llevan a cabo estos efectos se describen en la figura 4.5.

4.3.4. Aplicaciones de los FOS

Los FOS se emplean entre otros en alimentación como sustituto de grasas y modificante de la textura. En concentraciones bajas las soluciones de FOS son viscosas, mientras que en concentraciones de 30 %, forman un gel consistente similar a los observados en alginatos, carragenatos, etc. Las características del gel son dependientes de la temperatura, agitación, longitud de la cadena y concentración de FOS.

Los usos industriales, en alimentación humana y nutrición abarcan la sustitución de grasas ("mayonesas lights", quesos "bajos en calorías"), reducir el contenido calórico (sucedáneos de chocolate), retención de agua (pastelería, panificación, embutidos, en productos congelados que después son calentados en microondas, en confitería se aplica en los dulces garapiñados), evitar la formación de cristales (heladería), para la estabilización de espumas y emulsiones (aprovechando el sinergismo que presentan al ser combinados con surfactantes y gomas, se emplea esto en la manufactura de margarinas) y en general para modificar la textura o cremosidad de algunos alimentos (Fooks y Gibson, 2002; Mattila-Sandholm, 2002; Folleto Frutafit).

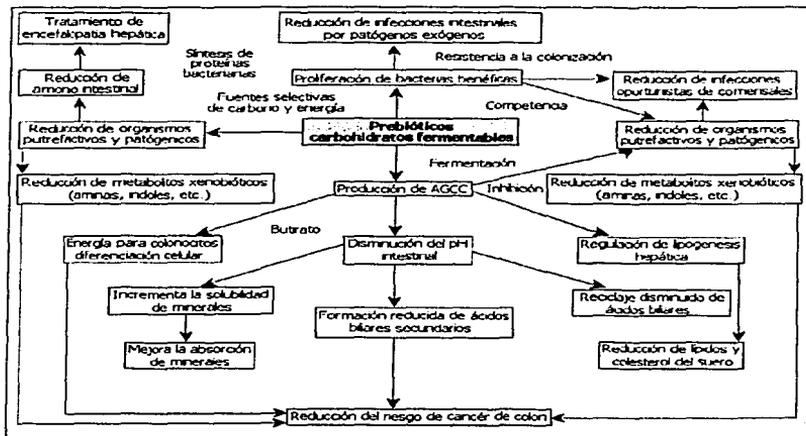


Fig. 4.5. Posibles mecanismos de la acción de prebióticos. El papel fundamental de las sustancias prebióticas es el de servir como fuentes de carbono específicas para las bacterias probióticas. AGCC = ácidos grasos de cadena corta (Escalante, 2001).

5. METODOLOGÍA

5.1. RECOLECTA Y TRATAMIENTO DEL AGUAMIEL

La recolección del aguamiel se llevó a cabo de manera tradicional: el tlachiquero (como llaman a la persona que colecta el aguamiel) destapó la cavidad donde estaba el aguamiel y procedió a extraerlo con el "acocote", que es una especie de calabaza alargada y hueca a la que se le han perforado ambos extremos, depositándolo en botellas de vidrio (previamente esterilizadas) que se transportaron en hielo al laboratorio.

Se trabajó con muestras provenientes de la delegación Milpa Alta (San Pedro Atocpan y San Bartolo Chicomulco), Coatepec (Edo. de Mex.) y de varias zonas productoras del estado de Hidalgo (Actopan, Tulancingo, Tepeapulco, Meztlitlán y Pachuca).

Para conservar íntegramente el aguamiel, al llegar las muestras al laboratorio fue necesario hacer un filtrado grueso, a través de algodón, para eliminar materia extraña (basura e insectos). Posteriormente se pasteurizaron, dejando calentar el autoclave hasta que los vapores de agua se condensaron en la tapa, se introdujeron las botellas de aguamiel cerradas, se tapó el autoclave y sin cerrar las llaves se pasteurizó por 15 minutos a 85° C. Esto se hizo con el fin de desnaturalizar enzimas nativas y matar microorganismos. Finalmente se dividió la muestra en frascos de menor volumen que se mantuvieron en congelación hasta antes de ser analizadas.

5.2. ACONDICIONAMIENTO DEL AGUAMIEL

Dado que el análisis de los aguamieles se llevó a cabo por HPLC, fue necesario hacer un acondicionamiento de la muestra. Por tal razón y para evitar que la columna empleada se obstruyera, se tuvo que eliminar la proteína que contenían los aguamieles. Así que para tal fin, se compararon 3 técnicas diferentes:

- [1] Precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 10 %
- [2] Precipitación con sulfato de zinc ($ZnSO_4$) 0.3 M e hidróxido de bario ($BaOH$) 0.3 M
- [3] Ultrafiltración con una membrana de corte de 30 kDa.

Para comprobar la eficiencia de la eliminación de proteína, se cuantificó ésta, antes y después del empleo de las técnicas mencionadas, usando el método de Lowry (Lowry y col. 1951). Ver anexo 1 para la descripción completa de estas técnicas.

5.3. CUANTIFICACIÓN DE FOS

Los aguamieles desproteinizados se analizaron por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, LABALIANCE, USA) que contaba con un detector de masas (tipo "light scattering", PLS-1000, Polymer Laboratories, USA) para identificar los componentes de la muestra y obtener los cromatogramas. Para poder analizar estos cromatogramas, primero se determinaron los tiempos de retención de los patrones comerciales con que se contaba (fructosa, glucosa, sacarosa, rafinosa, estaquiosa y FOS de 10 unidades), después se realizaron

curvas de referencia para la relación área-concentración que presentan cada uno de estos mismos patrones.

Además hubo que establecer la técnica que nos permitiera sintetizar los patrones de los FOS de 3 a 9 unidades.

Finalmente la cuantificación de los componentes de las diferentes muestras de aguamiel, se llevó a cabo al observar que existe una relación entre las pendientes de las ecuaciones de regresión lineal de las curvas de referencia, antes mencionadas, de cada patrón comercial que se empleó, con lo cual se pudo elucidar las ecuaciones de los FOS de 3 a 9 unidades.

5.3.1. Condiciones del equipo

Los aguamiel desproteinizados y todas las soluciones de patrones que se inyectaron en el equipo del HPLC fue bajo las siguientes condiciones:

- HPLC: se usaron la precolumna y columna Rezex RNO-Oligosaccharide (Phenomenex, USA) a 70° C y 950 psi de presión con agua desionizada como fase móvil a un flujo de 0.3 mL/min.
- Detector de masas (PLS-1000): este detector que cuenta con una lámpara de tungsteno/halogeno y un detector de fotodiodo; se usó con un flujo de nitrógeno de 1.5 SLM y temperaturas en el evaporador y nebulizador de 90° C y 110° C respectivamente.

5.3.2. Patrones para análisis cromatográfico

Para cuantificar los mono-, di- y oligosacáridos presentes en los aguamiel se elaboraron curvas de referencia de los patrones de fructosa, glucosa, sacarosa y para los FOS de 3, 4 y 10 unidades se emplearon rafinosa, estaquirosa e inulina HD (nombre comercial de un fructooligosacárido de 10 unidades, 9 de fructosa y 1 de glucosa) respectivamente. Antes de esto primero fue necesario determinar los tiempos de retención y la respuesta que presentan estos patrones en el equipo.

5.3.2.1. Determinación de tiempos de retención (TR) y respuesta de los patrones comerciales

Se determinaron los tiempos de retención inyectando las siguientes soluciones de patrones al HPLC:

- Solución de fructosa (β -D-(-)-fructosa, Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA) al 0.5% en agua desionizada.
- Solución de glucosa (β -D-(+)-glucosa, Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA) al 0.5% en agua desionizada.
- Solución de sacarosa (sacarosa, Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA) al 0.5% en agua desionizada.
- Solución de rafinosa (rafinosa, DIFCO, USA) al 0.5% en agua desionizada.
- Solución de estaquirosa (estaquirosa, α -D-galactosil- α -D-galactosil- α -D-glucosil- β -D-fructosa, Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA) al 0.5% en agua desionizada.

- Solución de inulina HD (Frutafit, Imperial Suker, USA) al 0.5% en agua desionizada.

Una vez establecidos los tiempos de retención, también se comprobó que la respuesta de la señal respecto al área, fuera la misma en mezclas de estos patrones que de forma individual.

5.3.2.2. Elaboración de curvas de referencia de patrones comerciales

Para producir las curvas de referencia se prepararon soluciones en intervalos de concentración de 0.01-0.05% (P/V) de fructosa, glucosa, estaquiosa, rafinosa e inulina HD. En el caso de la sacarosa fue necesario preparar soluciones en un intervalo de 0.01-0.7%, porque se sabía que los aguamiel pueden presentar una alta concentración de este azúcar. Para facilitar el balance de materia, estos valores de porcentaje se transformaron en $\mu\text{mol/mL}$, quedando de la siguiente manera:

- Fructosa y glucosa: soluciones de 0.555 a 2.777 $\mu\text{mol/mL}$.
- Sacarosa: soluciones de 0.292 a 20.467 $\mu\text{mol/mL}$.
- Estaquiosa: soluciones de 0.198 a 0.992 $\mu\text{mol/mL}$.
- Rafinosa: soluciones de 0.150 a 0.751 $\mu\text{mol/mL}$.
- Inulina HD: soluciones de 0.061 a 0.305 $\mu\text{mol/mL}$.

5.3.2.3. Elaboración de patrones para los FOS de 3 a 9 unidades

Se elaboraron patrones de todos los FOS aprovechando el hecho de que la inulina HD no es un compuesto 100% puro, ya que contiene un 8.6% de otros componentes (el fabricante indica en su ficha técnica que solo son mono y disacáridos, pero se sabe por una prueba previa en el HPLC que hay una gran variedad de componentes). Para lograr este fin se realizaron los siguientes pasos:

1. Aislamiento de los componentes de la inulina HD
2. Verificación del aislamiento
3. Identificación de los componentes aislados

5.3.2.3.1. Aislamiento de los componentes de la inulina HD

- ❖ Se inyectó una solución de inulina HD al 40% en agua desionizada, para obtener un cromatograma y así tener los tiempos de retención (TR) de cada una de las señales obtenidas.
- ❖ Nuevamente se inyectó esta solución, solo que en esa ocasión la muestra no se hizo pasar por el detector de masas, sino que se colectaba, programando el equipo para cambiar de vial cada 30 segundos, por lo que se obtenían volúmenes de 150 μL por fracción.

5.3.2.3.2. Verificación del aislamiento

- ❖ Como se contaba con el dato del TR para cada señal, se escogieron la o las fracciones en donde pudiera estar el componente que se deseaba. Para

comprobar esto se inyectaron 30 μL de la muestra. Por ejemplo, si del cromatograma se obtenía un tiempo de retención de 23.2 minutos para alguna señal, este debía encontrarse en la fracción 46.

5.3.2.3.3. Identificación de los componentes aislados

- ❖ Comprobando el aislamiento del componente, se hidrolizaba la muestra con 10 μL de inulinasa (producida en el laboratorio de *Kluyveromyces marxianus* CDBL278, según Cruz-Guerrero y col., 1995) en un baño de temperatura controlada a 50° C durante 1 hora.
- ❖ Se filtró el hidrolizado con membrana de corte de 30 KDa (Pall USA), ejerciendo la presión en los tubos con membrana mediante centrifugación a 5000 r.p.m. por 15 min a una temperatura de 4°C, para eliminar la enzima agregada. Se tuvo el cuidado de registrar el volumen que se centrifuga y el volumen final.
- ❖ El filtrado obtenido se inyectó en el HPLC, y del cromatograma obtenido se calculó el grado de polimerización del FOS, por la relación fructosa:glucosa.

5.3.2.4. Determinación de los tiempos de retención para la toda la gama posible de FOS

Ya que la técnica para determinar a que grado de polimerización tuvo sus limitantes, los tiempos de retención para toda la posible gama de FOS y FOS' se determinaron por separado a partir de graficar los tiempos de retención experimentales como función del grado de polimerización al interpolar en la ecuación que resultó de calcular una regresión logarítmica.

5.3.2.5. Elaboración de curvas de referencia de patrones para los FOS de 3 a 9 unidades

Para poder cuantificar todos los FOS, se graficaron las pendientes (m) de las ecuaciones de regresión lineal de las curvas de referencia de los 5 estándares comerciales empleados en función del peso molecular. Al obtener una aceptable correlación, se procedió a interpolar dentro de la curva los nuevos valores de pendiente para los patrones comerciales y los FOS sintetizados en el laboratorio. La forma de comprobar que este modelo propuesto funciona correctamente fue inyectando concentraciones conocidas de diferentes patrones y calculando el valor de concentración usando las ecuaciones que originalmente se tenían para cada patrón y a su vez con los nuevos valores de pendiente, obtenidos de la gráfica de pendientes en función de los pesos moleculares.

5.3.2.6. Análisis de cromatogramas

Una vez que se contó con todos estos datos (tiempos de retención, ecuaciones para calcular concentraciones), se cuantificaron los FOS presentes en cada muestra de aguamiel. El análisis de los cromatogramas empezó por establecer que señal correspondía a que FOS, mono- o disacárido. Después con ayuda de las

pendientes que se calcularon en la sección anterior, se determinaron las concentraciones que representaban estos componentes.

5.3.2.6.1. Determinación del grado de polimerización

Dado que los cromatogramas de los aguamieles presentaron un mayor número de señales, se concentró algunas muestras por ultrafiltración y se siguió la metodología descrita en 5.3.2.1. para determinar el grado de polimerización de algunos compuestos que se pudieron aislar.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. MUESTRAS DE AGUAMIELES

Se trabajó con muestras de aguamieles colectadas en algunas zonas productoras de diferentes estados de la República Mexicana; en la tabla 6.1. se describen con detalle algunos datos de la colecta.

Tabla 6.1. Descripción del origen de las muestras de aguamiel

Estado	Poblado	Datos de colecta
D. F.	San Bartolo Chicomulco (Milpa Alta)	Agave manso, colecta mañana, 12-05-2002
	San Pedro Actopan (Milpa Alta)	Agave manso, colecta tarde, 05-01-2003
Hidalgo	Actopan A	Agave manso, colecta mañana, 16-05-2002
	Actopan B	Agave manso, colecta tarde, 16-05-2002
	Hidalgo IV	Agave manso, colecta tarde, 18-06-2002
	Pachuca A	Agave cimarrón, colecta mañana, 16-05-2002
	Pachuca B	Agave manso, colecta mañana, 16-05-2002
	Meztitlán	Agave manso, colecta tarde, 19-01-2003
	Tepeapulco	Agave manso, colecta tarde, 15-05-2002
	Tulancingo A	Agave manso, colecta tarde, 15-05-2002
	Tulancingo B	Agave manso, colecta mañana, 20-06-2002
México	Coatepec	Agave manso, colecta tarde, 18-06-2002

6.2. SELECCIÓN DE LA TÉCNICA PARA DESPROTEINIZAR LOS AGUAMIELES

Se compararon las siguientes técnicas para eliminar la proteína presente en las muestras de aguamiel:

1. Precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 10%
2. Precipitación con BaOH 0.3 M y ZnSO₄ 0.3 M
3. Ultrafiltración con membrana.

Para la selección se cotejaron los datos de proteína residual para cada técnica con los datos de proteína inicial en la correspondiente muestra (ver tabla 6.2.). Como se puede observar tenemos dos técnicas que eliminan con eficiencia la proteína; estas son: la precipitación con BaOH y ZnSO₄ y la ultrafiltración con membrana que dejan solo de un 4 a 5% de proteína residual. Para decidir de entre una de estas técnicas fue necesario inyectar las muestras desproteinizadas al HPLC.

Tabla 6.2. Cuantificación de proteína inicial y residual en algunas muestras de aguamiel.

Muestra	Proteína inicial (µg/mL)	Proteína residual para cada técnica (µg/mL)		
		Con TCA	Con BaOH y ZnSO ₄	Ultrafiltración
1	8008	845.9	387.4	396.5
2	7662	751.2	312.1	327.8

Al cotejar los cromatogramas obtenidos se encontró que los aguamieles a los que se les eliminó la proteína por precipitación presentan una menor área (ver tabla 6.3) en las señales obtenidas en comparación con los obtenidos en los cromatogramas de las muestras a las que se ultrafiltró; esta menor respuesta es entendible ya que la técnica de precipitación conlleva la dilución de la muestra, pero se encontró que también se obtenían un menor número de señales así que se decidió no ajustar las áreas de acuerdo a la dilución que se llevó a cabo (ver cromatogramas figuras 6.1a. y b).

A continuación se anexa la información que se extrae de los cromatogramas antes mencionados, los tiempos de retención (TR) y las áreas de las señales obtenidas, se puede observar que en el cromatograma obtenido de una muestra ultrafiltrada se aprecian un mayor número de señales y con una mayor respuesta en área, esto es fácilmente apreciable al comparar el área total.

Por tal motivo se decidió que la técnica más apropiada para eliminar la proteína de las muestras era la ultrafiltración con membranas de corte de 30 kDa.

Tabla 6.3. Áreas y TR de los cromatogramas del aguamiel de Tulancingo, tratado con BaOH y ZnSO₄, y por ultrafiltración.

Tratado con BaOH y ZnSO ₄		Tratado por ultrafiltración	
TR (min)	Área	TR (min)	Área
13.24	4349.07	13.31	17226.94
13.67	3323.9	13.99	3129.82
17.22	1492.13	17.98	26452.52
-	-	20.36	1370.67
22.29	453.05	22.33	2910.24
24.37	683	24.72	9645.62
26.5	472.67	26.37	1784.92
27.48	1019.72	27.84	9129.39
30.57	4268.99	30.7	6828.88
-	-	31.73	7827.17
35.9	29810.82	36.36	318945.4
38.33	1681.9	38.94	27318.18
43.74	38972.31	44.26	603553.33
46.65	30910.76	47.18	548813.49
Área total	117438.32	Área total	1584936.57

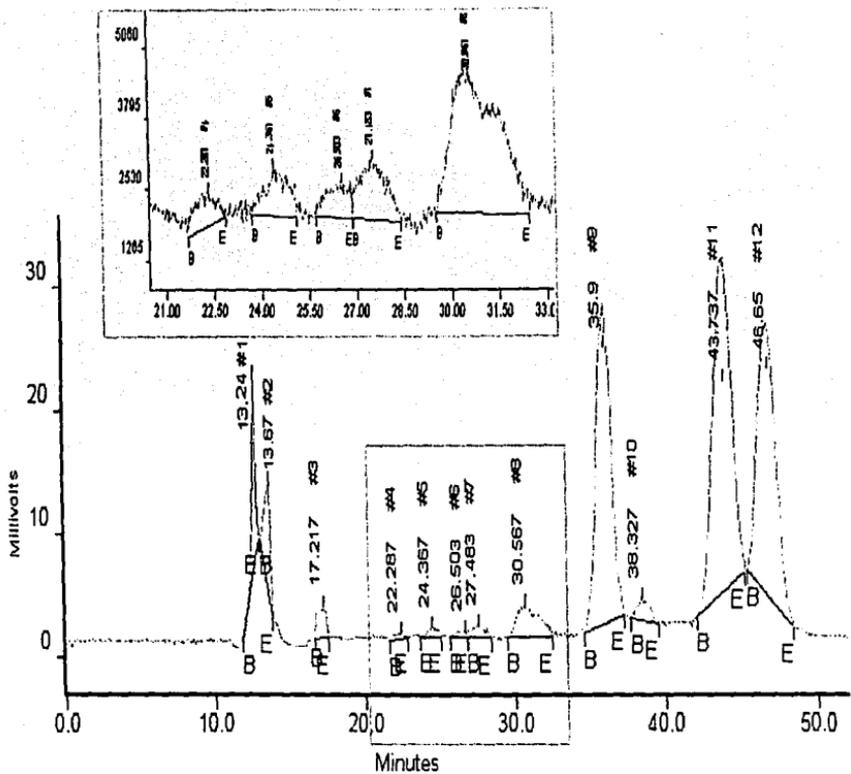


Fig. 6.1a. Muestra de Tulancingo A, tratada con BaOH y ZnSO₄

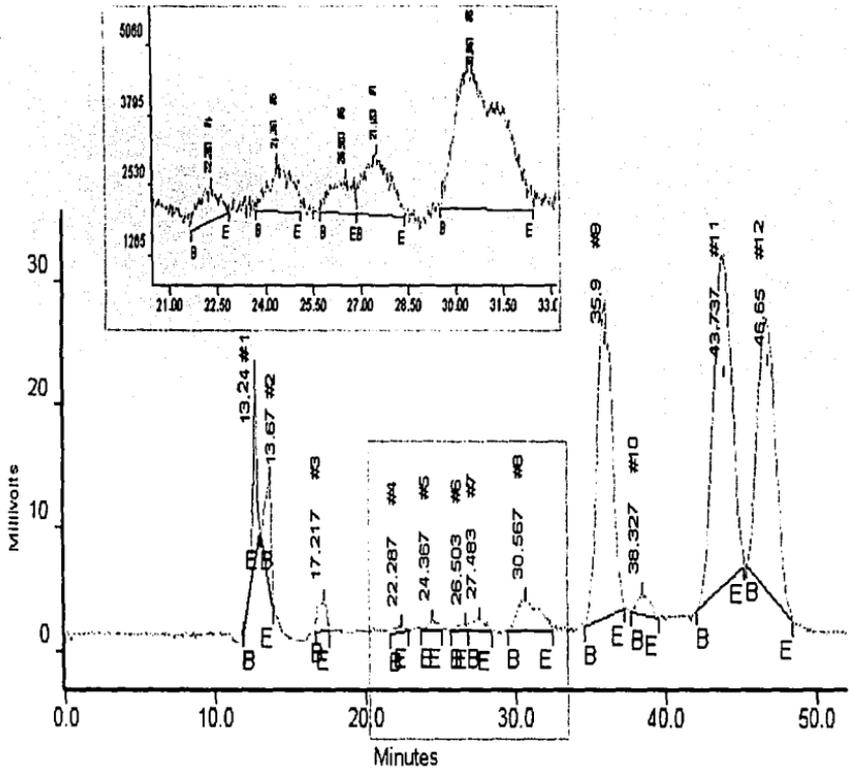


Fig. 6.1a. Muestra de Tulancingo A, tratada con BaOH y ZnSO₄

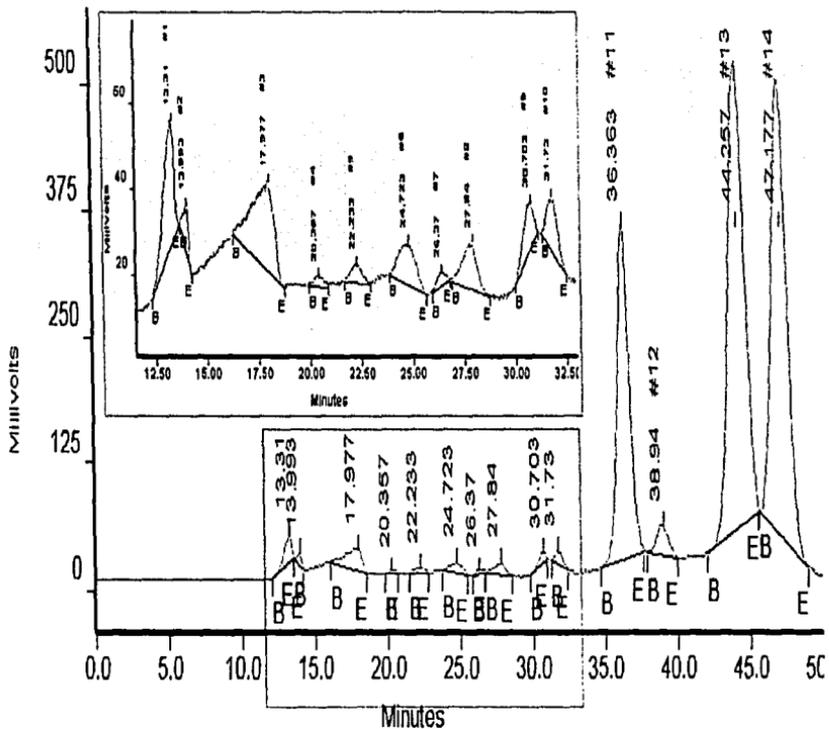


Fig.6.1b. Muestra de Tulancingo A tratada por ultrafiltración

L2

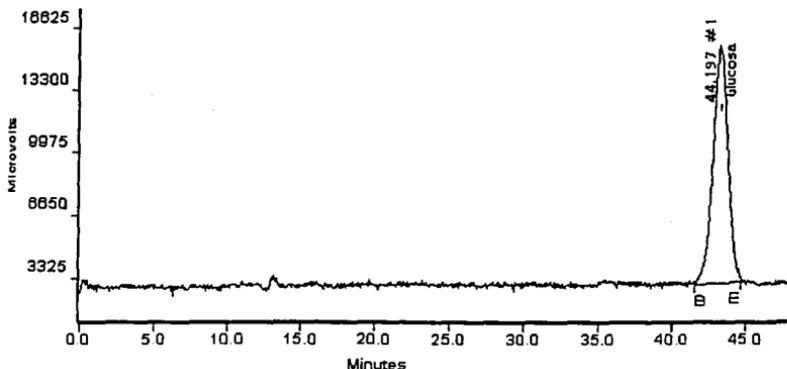
6.3. PATRONES COMERCIALES PARA ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Para analizar los cromatogramas de las muestras de aguamiel, fue necesario hacerlo de forma indirecta, al comparar los tiempos de retención de las señales obtenidas de los aguamieles con los de patrones comerciales y los aislados en el laboratorio. Para ello se inició por determinar los tiempos de retención para los patrones comerciales.

6.3.1. Determinación de los TR y respuesta para los patrones comerciales

Se utilizaron patrones comerciales de fructosa, glucosa, sacarosa, rafinosa, estaquiosa e inulina HD. Inicialmente se inyectaron soluciones de cada uno de estos compuestos para obtener su tiempo de retención, obteniendo cromatogramas como el de la figura 6.2a. Posteriormente se inyectó una mezcla de fructosa, glucosa, sacarosa, rafinosa y estaquiosa, excluyéndose a la inulina HD porque como ya se mencionó (sección 5.3.2.3) este patrón no es un compuesto 100% puro ya que contiene un 8.6% de otros componentes (fig. 6.3), observándose que la presencia de otros compuestos no influye en el tiempo de retención que se obtiene cuando se inyectó a cada compuesto por separado (fig. 6.2b).

6.2a.



6.2b.

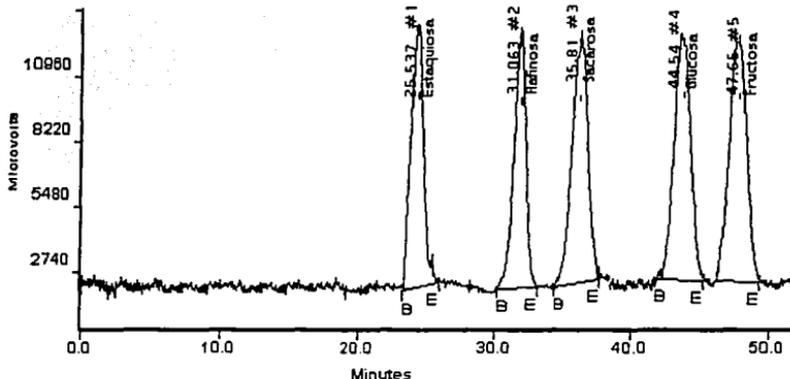


Fig. 6.2. a y b. Se observa como el tiempo de retención no varía para un patrón cuando está solo o cuando está en una mezcla.

Como se puede observar, las condiciones del equipo nos permiten tener una buena separación de las señales para cada patrón empleado; se puede asumir con esto que la columna empleada separa por exclusión molecular, es decir, deja eluir primero los compuestos de mayor tamaño y al último los de menor. Esto se ve claramente con los tiempos de retención que presentan la fructosa y la glucosa, que aunque son isómeros, eluyen en diferente tiempo porque la molécula de fructosa por su estructura de furanosa es de un menor tamaño con respecto a la de glucosa, que es una piranosa.

Al elaborar la solución con la mezcla de patrones se cuidó que éstos tuvieran la misma concentración en la que estaban en la solución individual, para corroborar que el área individual o en mezcla no variara.

Por otro lado, el hecho de que la inulina HD, que fue nuestro patrón para un FOS de 10 (con unidad terminal de glucosa), presente una variedad de compuestos, es un hecho que sería de suma importancia más adelante en esta investigación (ver fig. 6.3.)

Finalmente se debe señalar que los tiempos de retención que se obtienen en cada cromatograma pueden variar hasta unos 0.5 minutos, y en promedio los TR para los patrones comerciales con los que se trabajó se muestran en la tabla 6.4.

Tabla 6.4. Tiempos de retención de los patrones comerciales:

Compuesto	Tiempo de retención* (minutos)
Fructosa	47.5
Glucosa	43.8
Sacarosa	35.9
Rafinosa	31.06
Estaquiosa	25.54
Inulina HD	13.4

*Estos valores son promedios, puede haber una variación de hasta 0.5 min

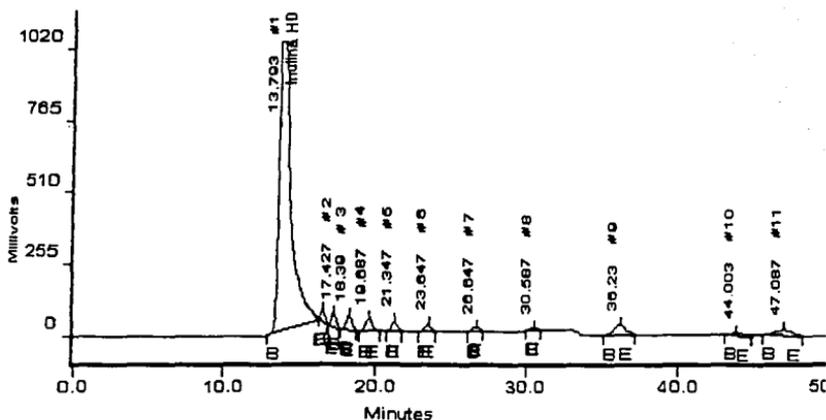


Fig. 6.3. Inulina HD y variedad de compuestos que presenta.

6.3.2. Elaboración de las curvas de referencia de los patrones comerciales

Para poder cuantificar la concentración de los componentes del aguamiel fue necesario elaborar curvas de referencia para los patrones empleados. Lo primero que se pudo examinar fue que el área obtenida para cada patrón dependía de la concentración de éste, esto de una forma lógica ya que al aumentar la concentración aumenta el área obtenida. Lo segundo que se ve es que compuestos que son isómeros al parecer tienen la misma respuesta en área a una misma concentración, como fue en el caso de fructosa y glucosa (véase tabla 6.5.), por lo

cual se puede trabajar con una misma curva de referencia para estos dos compuestos.

Tabla 6.5. Áreas obtenidas para diferentes concentraciones de fructosa y glucosa.

Concentración (mg/mL)	Áreas	
	Fructosa	Glucosa
0.1	2550.18	2736.84
0.2	5226.81	5211.35
0.3	7389.89	7660.95
0.4	13728.14	13731.27
0.5	15372.22	15254.5

*Los datos que se reportan son un promedio ya que las soluciones se inyectaron por triplicado obteniendo una σ máxima de ± 1.56

De igual manera que con fructosa y glucosa, se obtuvieron las áreas a diferentes concentraciones para los demás patrones, y al contar con estas series de datos se procedió a elaborar las curvas de referencia (ver tabla 6.6.)

Tabla 6.6. Ecuaciones y factores de correlación de las curvas de referencia de los patrones comerciales

Patrones	Ecuación	Factor de correlación (R)
Fructosa y glucosa	$y = 6093.1x - 1268.9$	0.9811
Sacarosa	$y = 7491.9x - 184.35$	0.9998
Rafinosa	$y = 9646.7x + 821.76$	0.9854
Estaquiosa	$y = 9264.6x + 99.721$	0.9749
Inulina HD	$y = 20328x + 75325$	0.9791

Donde las concentraciones (mg/mL) son las abscisas y el área (mm^2) son las ordenadas

Como se puede ver los factores de correlación que se obtuvieron nos muestran que la relación que hay entre concentración y área es prácticamente lineal. Las ecuaciones de las curvas se obtuvieron por regresión lineal y al examinarlas se observa que a no ser por la rafinosa, se podría afirmar que al ir aumentando el grado de polimerización aumenta también la pendiente, tal comportamiento no se presenta tan claro en las ordenadas al origen como en el caso de las pendientes.

6.3.3. Patrones para los FOS de 3 a 9 unidades

Como se hizo notar en la sección 6.3.1, la inulina HD presenta además del FOS de 10 unidades otros compuestos, siendo las 3 últimas señales las correspondientes a sacarosa, glucosa y fructosa respectivamente, así que este hecho se aprovechó para aislar los componentes que corresponden a estos compuestos y así determinar los tiempos de retención para los FOS de 3 a 9 unidades. Como ya se mencionó en la metodología, se realizó primero la inyección de una solución saturada de inulina HD (al 40% y en caliente para que la solución estuviera cristalina y completamente disuelta la inulina); el resultado obtenido se muestra en la figura 6.4.

3
2

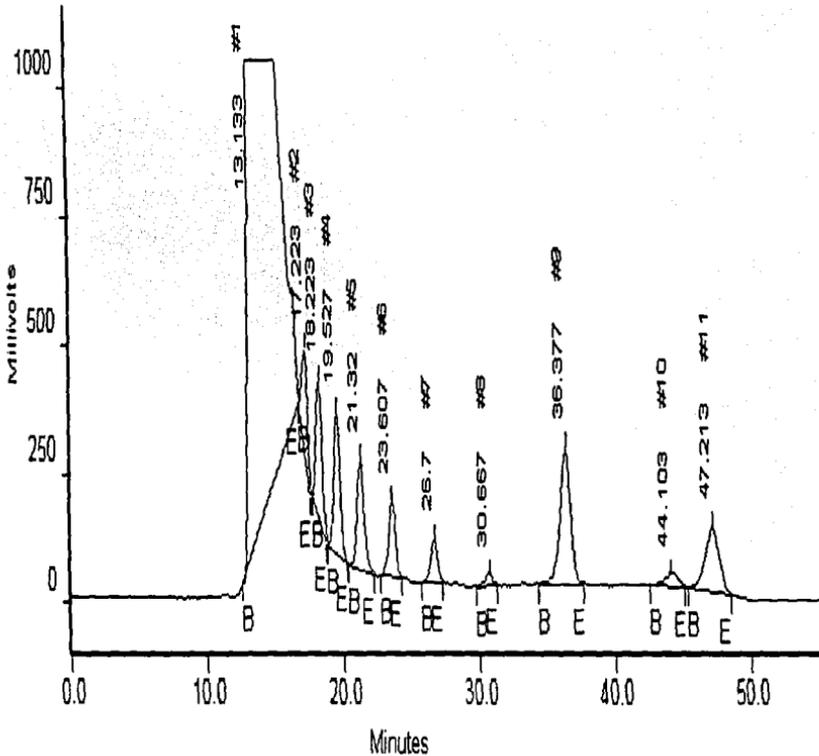
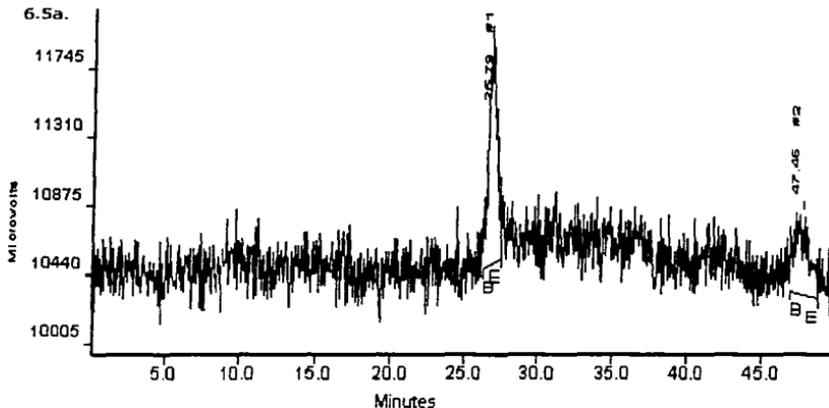


Fig.6.4. Inulina HD at 40%

Después de obtener este cromatograma se procedió a hacer una colecta de la muestra, seccionando esta corrida cromatográfica en fracciones de 150 μL , que se colectaban cada 0.5 min (30 segundos) en tubos numerados del 1 al 100. Así por ejemplo, el componente que aparece en 26.79 min, podía estar en los tubos 52 a 54, por lo que hubo que inyectar un poco de muestra (20 μL) a fin de determinar si solo estaba en un tubo o repartido en varios, de esta forma se aseguraba la localización del componente y se procedía a su hidrólisis. Una vez que se analizó el cromatograma obtenido de la hidrólisis, se calculó la relación de áreas que hay entre glucosa y fructosa, de dicha relación se determinó el grado de polimerización del compuesto que generó esa señal.

Un ejemplo de los cromatogramas de la fracción colectada y de su posterior hidrólisis se muestran en los cromatogramas de las figuras 6.5. a y b. Se observa como se obtiene solamente fructosa y glucosa de la hidrólisis del componente aislado en este caso en el tubo 53, el cual tiene un tiempo de retención de 26.79 minutos.



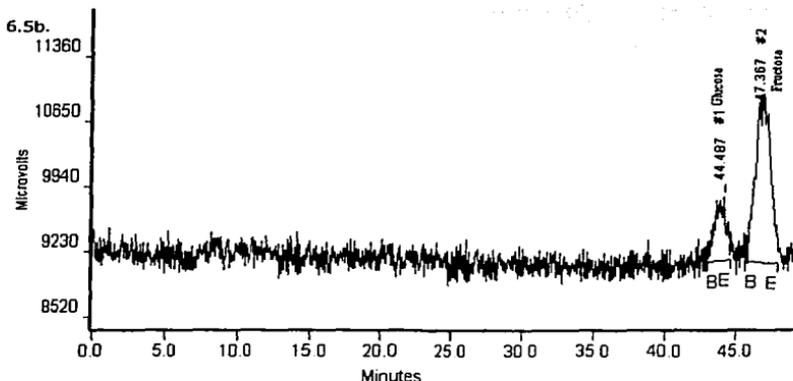


Fig. 6.5. a y b. En el cromatograma "a" se muestra la identificación de un componente aislado durante la colecta. Y en "b" se muestra como al hidrolizarlo se obtiene solo fructosa y glucosa.

Después de analizar los cromatogramas de las figuras 6.5. se obtuvieron los datos de área de estas señales, y al calcular la relación fructosa:glucosa se logró determinar la longitud de este compuesto.

Tabla 6.7. Datos para calcular la relación fructosa:glucosa (F:G)

	TR	Area
Cromatograma 6.5a.	26.79	954.37
	47.46 (fructosa)	300.47
Cromatograma 6.5b.	44.49 (glucosa)	662.42
	47.37 (fructosa)	2315.30
Relación	F:G = (2315.30-300.47)/662.42 = 3.041 Por lo tanto se trata de un FOS de 4 unidades.	

Cuando se inyectaba la muestra hidrolizada, se eliminaba la enzima que llevó a cabo la hidrólisis, por lo que se ultrafiltró un volumen de la reacción. Para llevar a cabo el cálculo de la relación fructosa:glucosa es necesario hacer la consideración de que al inicio de la hidrólisis en el medio de reacción ya existía una cantidad de fructosa, por lo que esta se resta a la fructosa final que se obtiene en el cromatograma de la fig. 6.5b.

De esta forma se realizó el análisis de algunos componentes que estaban presentes en la inulina HD, encontrando que también hay señales producidas por fructooligosacáridos compuestos únicamente de fructosa; a estos de les denominó

como FOS', para diferenciarlos de los que tienen una unidad de glucosa terminal. Los cromatogramas de las figuras 6.6a. y 6.6b. muestran como se encontró la composición de estos FOS'. El grado de polimerización en estos casos se determinó por el tiempo de retención que presenta y por la longitud de cadena de los compuestos que eluyeron antes y después que el componente en estudio. Por ejemplo, en los cromatogramas que se muestran enseguida, se determinó que corresponde a un FOS 5', porque eluye entre un FOS de 4 (ver tabla 6.7) y uno de 6.

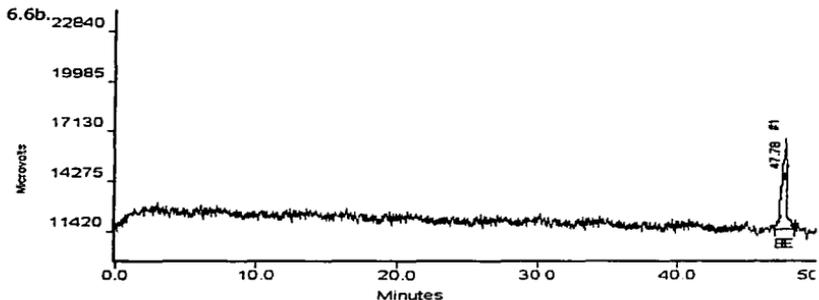
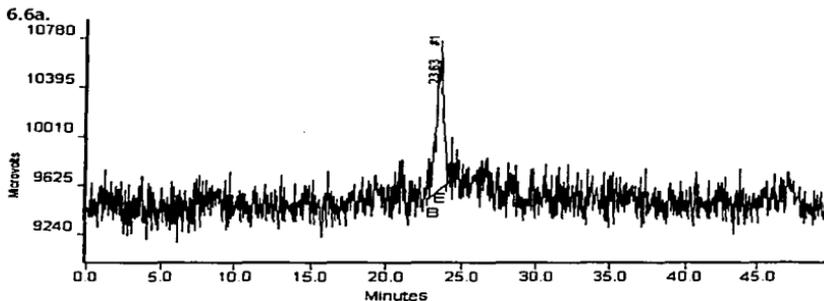


Fig. 6.6. a y b. El cromatograma de la figura 6.6b comprueba que el componente que se hidrolizó (fig. 6.6a) esta formado solo por unidades de fructosa, puesto que se obtiene solo fructosa en su hidrólisis.

Al finalizar el análisis de la colecta se pudo determinar el grado de polimerización (GP) para algunos de los componentes que se obtienen de la inyección de inulina HD al 40% (ver tabla 6.8 y fig. 6.4).

Tabla 6.8. Determinación del grado de polimerización de algunos compuestos encontrados en la inulina HD.

# de señal en el cromatograma	TR* (min)	GP**
1	13.133	10
2	17.223	8
4	19.527	7'
5	21.32	6
6	23.607	5'
7	26.79	4
9	36.377	2 (sacarosa)

TR* = tiempo de retención
GP** = grado de polimerización

Una vez que se tuvieron estos datos, se calcularon el resto de los tiempos de retención para toda la gama de FOS que pudieron encontrarse (FOS de 3 a 10 y de 3' a 10'); esto se realizó al obtener una regresión logarítmica de los datos de GP en función del TR de los componentes que se identificaron; es de resaltar que solo se ocuparon los TR de los compuestos que presentaron una unidad terminal de glucosa, incluyendo por tal razón a la sacarosa. Se optó por una regresión logarítmica porque nos presentaba un mejor factor de correlación (Ec. 6.1).

Del mismo modo se realizó una regresión logarítmica para los datos de los FOS', obteniéndose como resultado la ecuación 6.2.

$$y = -13.828\ln(x) + 45.734 \quad \text{con } R = 0.9984 \quad (\text{Ec. 6.1.})$$

$$y = -14.539\ln(x) + 47.424 \quad \text{con } R = 0.9996 \quad (\text{Ec. 6.2.})$$

Una vez que se obtuvieron estas dos ecuaciones se calcularon los tiempos de retención para toda la posible gama de FOS (ver tabla 6.9.)

Tabla 6.9. Determinación de los TR para toda la gama de FOS

TR experimental	TR calculado	FOS	TR experimental	TR calculado	GP
13.4	13.894	10	-	13.947	10'
-	15.351	9	-	15.479	9'
17.223	16.979	8	-	17.191	8'
-	18.826	7	19.527	19.132	7'
21.32	20.958	6	-	21.374	6'
-	23.479	5	23.607	24.024	5'
26.79	26.564	4	-	27.269	4'
-	30.542	3	-	31.451	3'

Cálculos realizados con las ecuaciones 6.1. y 6.2.

Al revisar los resultados se encontró que los tiempos de retención están muy cercanos en los casos de FOS de 10, 10', 9 y 9'. En el caso de los FOS de 10 y 10' se estableció la diferencia entre estos al tener de guía al TR que presentó la inulina HD (patrón para FOS de 10 unidades) que fue de 13.4 minutos; de esta forma se pudo diferenciar un fructooligosacárido con unidad terminal de glucosa de uno compuesto solo de unidades de fructosa.

Por otro lado, los demás FOS no presentan este problema, pues como se ve desde los tiempos de retención de los patrones, entre menor es el grado de polimerización de la cadena los compuestos eluyen con una mayor separación en tiempo.

6.3.4. Elaboración de curvas de referencia para FOS de 3 a 9 unidades

Una vez que se contaban con los datos de tiempo de retención para toda la gama posible de FOS era necesario contar con una herramienta que nos permitiera el cuantificar éstos. Como se había mencionado en la sección 6.3.2., al analizar las ecuaciones de regresión lineal de las curvas de referencia, se observa que existe una tendencia de ir aumentando la pendiente conforme aumenta el grado de polimerización, así que de éste modo se graficaron las pendientes de dichas ecuaciones contra el grado de polimerización (ver tabla 6.10) encontrándose una buena correspondencia lineal.

Se trato del mismo modo establecer una relación para las ordenadas al origen de estas mismas ecuaciones, pero en este caso no se obtuvieron resultados satisfactorios.

Tabla 6.10. Datos para la obtención de la ecuación que nos relaciona pendientes contra grado de polimerización

Patrones	Grado de polimerización	Pendiente
Fructosa y glucosa	1	6093.1
Sacarosa	2	7491.9
Rafinosa	3	9646.7
Estaquirosa	4	9264.6
Inulina HD	10	20328
ECUACIÓN		$y = 1166.9x + 5206.8$
FACTOR DE CORRELACIÓN (R)		0.9144

Con la ecuación de esta curva de referencia, se recalcularon las pendientes para todos los componentes en estudio. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla 6.11. Se marcan de forma general los FOS, sin importar si son FOS' o no, aprovechando el hecho de que los isómeros presentan una misma respuesta de área para una concentración dada, hecho que se observó entre la glucosa y la fructosa. Este hecho se comprobó también cuando se realizaron pruebas de la efectividad de estas pendientes recalculadas; esto se hizo al contar

con unas áreas para concentraciones conocidas de los diferentes patrones usados (glucosa, sacarosa, rafinosa, estaquiosa e inulina HD) y con ayuda de las ecuaciones de regresión lineal de las respectivas curvas de referencia y las pendientes recalculadas, se obtuvieron las concentraciones a las que correspondían dichas áreas. Lo que se encontró es que entre los valores que se obtienen de las ecuaciones de las curvas de referencia y los que se calculan con las pendientes recalculadas, existe un máximo de 4% de diferencia, lo cual nos demostró que las pendientes que se recalcularon eran una buena herramienta en el cálculo de las concentraciones.

Tabla 6.11. Pendientes recalculadas para todos los compuestos en estudio.

COMPUESTO	PENDIENTE
FOS 10	20052.2
FOS 9	18471.0
FOS 8	16889.8
FOS 7	15308.6
FOS 6	13727.4
FOS 5	12146.2
FOS 4	10565.0
FOS 3	8983.8
DIMEROS	7402.6
MONOMEROS	5821.4

Con estas nuevas pendientes fue posible calcular la concentración en la que se presentaron los componentes de los aguamieles.

6.4. Análisis de aguamieles

Una vez que se contaba con todas las herramientas necesarias para identificar y cuantificar las señales que se obtuvieran en los cromatogramas de los aguamieles, se pudo dar inicio al análisis de estos.

Para esto se inyectaron las muestras desproteínizadas por medio de ultrafiltración, se integraron las señales obtenidas para contar con los tiempos de retención y las áreas. Una vez que se contó con esos datos, se compararon con los tiempos de retención que se establecieron para toda la gama de FOS, se identificaba a que FOS correspondía cada señal y se seleccionaba la pendiente recalculada (de la sección anterior) correspondiente para realizar el cálculo de la concentración para estos componentes; un ejemplo de esto se muestra en la tabla 6.12.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 6.12. Resultados para el aguamiel de Actopan A.

No. señal	Nombre	TR (min)	Area	% (p/v)	% azúcares
1	FOS 10	13.45	12909.78	0.10546	1.7884
2	FOS 9	14.26	3791.68	0.03030	0.5138
3	FOS 7	18.73	41858.6	0.31499	5.3419
4	FOS 6'	22.09	1334.73	0.00963	0.1632
5	FOS 5'	24.39	7622.25	0.05196	0.8812
6	FOS 4	26.32	1230.15	0.00775	0.1315
7	FOS 4'	27.37	2387.36	0.01505	0.2552
8	FOS 3	30.67	7292.65	0.04091	0.6938
9	FOS 3'	31.61	1615.91	0.00907	0.1537
10	Sac	36.4	691215.61	3.19341	54.1568
11	F-F	38.94	12551.3	0.05799	0.9834
12	Glu	44.18	370269.3	1.14489	19.4160
13	Fru	47.09	295988.66	0.91521	15.5209
TOTAL			1450067.98	5.89661	100.00
			*TOTAL DE FOS	0.64310	

*Total de FOS, es la suma de todos los componentes encontrados en la muestra exceptuando la sacarosa, glucosa y fructosa

Al analizar los resultados para este aguamiel se ve que no existe en él toda la gama de FOS, pero el que se encuentra en mas alta concentración es el de 7. Viendo las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa nos damos cuenta que estas son prácticamente el 90% del total de los componentes. Otro hecho que se debe resaltar, es que en este aguamiel se encontró una señal en el minuto 38.94, por lo cual se realizó una concentración de la muestra de aguamiel para realizar una colecta, igual que se realizó para los componentes de la inulina HD (ver secciones 5.3.2.3.1 a la 5.3.2.3.3.), encontrándose que esta compuesto por dos unidades de fructosa, por tal razón la concentración que se calcula, usando la pendiente recalculada para los dímeros, se le suma al total de los FOS 2'.

La suma de este disacárido, al que también podemos llamar FOS 2', es por la definición de oligosacáridos que dan la International Union of Pure and Applied chemistry y la International Union of Biochemistry, las cuales consideran a éstos como cadenas de azúcares con un grado de polimerización de 2 a 10 unidades (Van Looy col., 1999). Además en la bibliografía consultada (Cho y col., 2001; Shue y col., 2001; Kim y col., 1997; Yun J. W., 1996) se encontró que en la producción de FOS, ya sea por hidrólisis de inulina o síntesis de estos a partir de sacarosa (ver sección 4.3.), puede existir la formación de este dímero de fructosa y de otros FOS con diferente grado de polimerización. Además en los reportes también encontramos que (Bielecka y Majkowska, 2002; Fooks y Gibson, 2002; Guigoz y col., 2002; Zubillaga y col., 2001) cuando se hacen estudios de la eficiencia de los FOS como prebióticos se utilizan FOS de marcas comerciales, señalando en algunos casos el proceso por el cual se sintetizaron, pero nunca se hace la referencia de que se usen solo FOS con cierto grado de polimerización, sin embargo en algunas investigaciones se hace una comparación de estos FOS con algunos otros azúcares, entre ellos la sacarosa, dando como resultado que ésta no

tiene ningún efecto prebiótico. Por estos motivos es que se considera a este disacárido y no a la sacarosa en el total de FOS con potencial prebiótico encontrados en el aguamiel.

Para poder comparar entre los aguamieles se dividieron en dos grupos. En el primero se incluyen los aguamieles de Milpa Alta, Coatepec, Tepeapulco y las dos muestras de Tulancingo. En el segundo grupo están el resto de los aguamieles del estado de Hidalgo. Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas 6.1. y 6.2. En el grupo 1 se tiene que el FOS que mas aparece en los componentes es el de 10, que en los aguamieles del estado de Hidalgo y la muestra de Coatepec no existen FOS de 9', 8 y 8', y de manera contraria el dímero de fructosa se presenta en estos y no se encuentra presente en las muestras de Milpa Alta.

Analizando el grupo 2 se observa que el disacárido F-F se encuentra presente en todas las muestras del estado de Hidalgo así como también los FOS de 10, 5' y 3. En este grupo no se encuentran FOS de 9' y 8. y prácticamente se carece también de los FOS de 10' y de 4 (ver tabla 6.14)

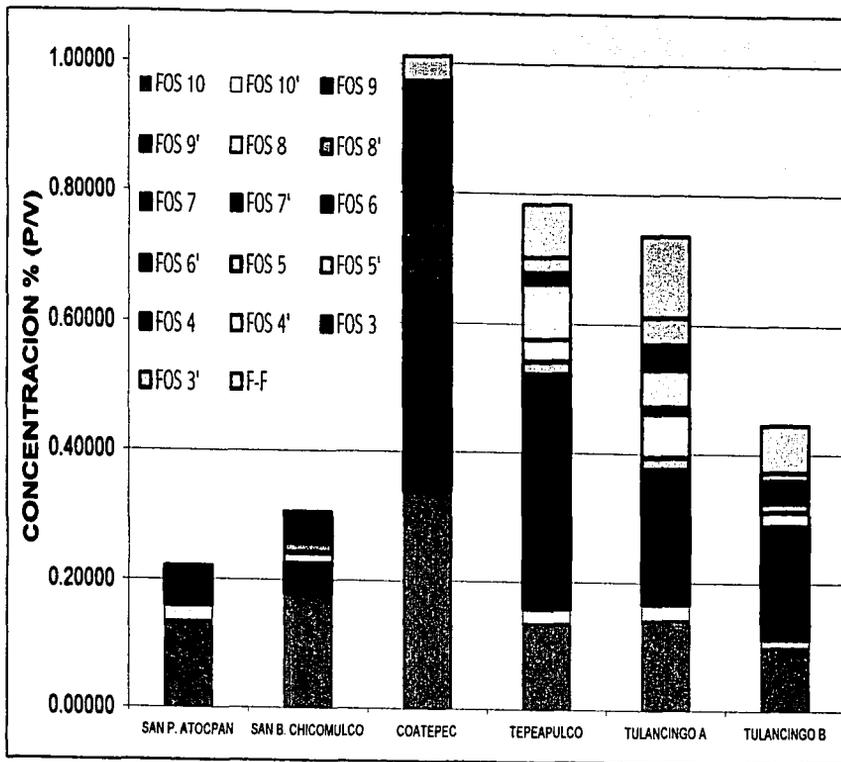
Finalmente, al analizar en conjunto todas las muestras se observa que ninguno cuenta con toda la gama de FOS, como ya se había mencionado anteriormente, los aguamieles del estado de Hidalgo no contienen FOS de 8' ni de 9, pero los mas abundantes en concentración y frecuencia de contenido son los FOS de 10, 7, 5, 5', 4', 3, 3' y el dímero de fructosa. Al comparar esto con los otros 3 aguamieles con que se contaba (dos de Milpa Alta y otro de Coatepec, Edo. Mex.), se ve que los FOS que se encuentran con mayor frecuencia son los de 10, 7 y 3 unidades.

Sin embargo individualmente las muestras que presenta la mayor diversidad de contenido de FOS son la de San Pedro Atocpan, Milpa Alta, y la registrada como Hidalgo IV, esto se aprecia fácilmente en la gráfica 6.3., donde se presentan el porcentaje que representa cada fructooligosacárido en el total de FOS que contiene cada muestra.

La variabilidad que hay en cuanto a la presencia o ausencia de algunos FOS se puede atribuir al tipo de enzimas endógenas y exógenas que se presenten en la planta de donde proviene la muestra; de la misma forma se puede afirmar que el tipo de clima y la altura son factores que influyen en el contenido y variedad de FOS encontrados.

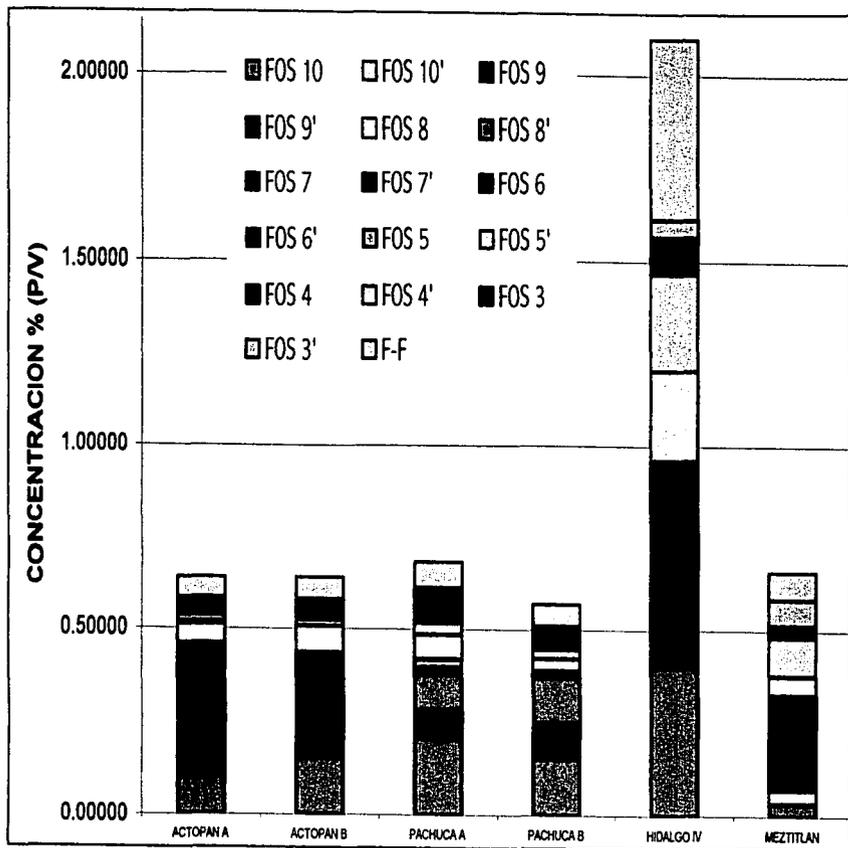
En cuanto al contenido total de azúcares, se observa que el componente mayoritario en todos los aguamieles es la sacarosa seguido de la glucosa y fructosa (ver tablas 6.13 y 6.14).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



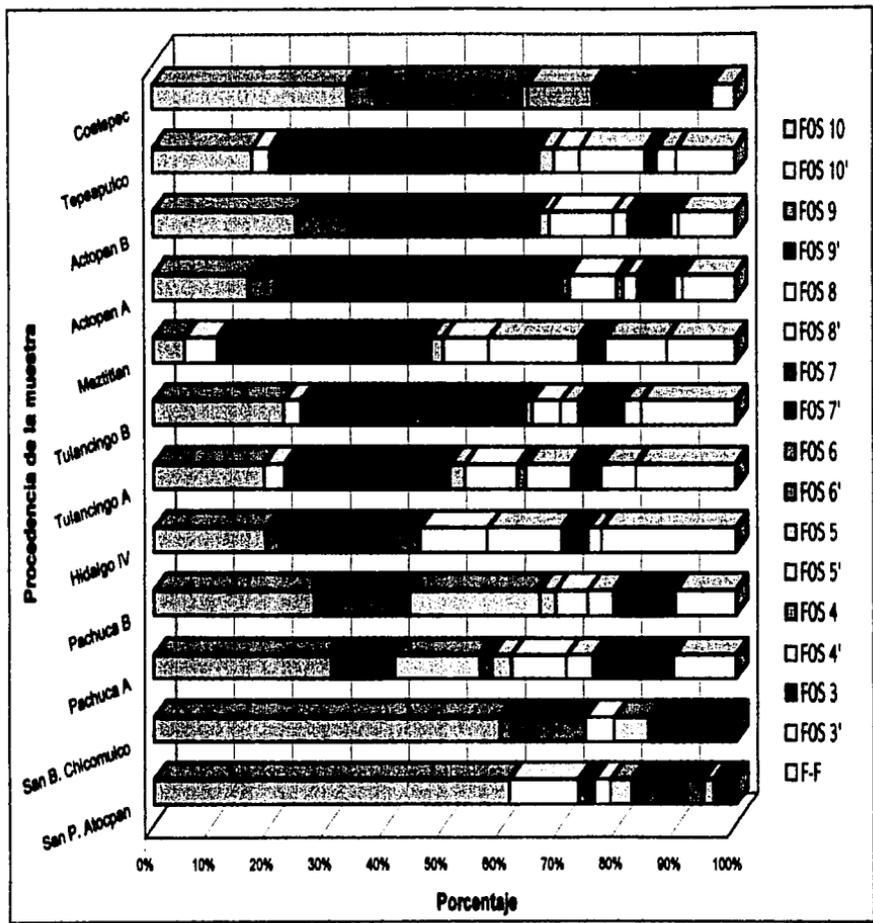
41 Gráfica 6.1. Comparación de los FOS encontrados en las muestras de aguamieles del grupo 1

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Gráfica 6.2. Comparación de los FOS encontrados en las muestras de aguamieles del grupo 2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 6.3. Valores normalizados del contenido de FOS

73

Existía ya un antecedente del contenido fructooligosacáridos (Martínez del Campo, 1999) en donde se reportaba un contenido de éstos entre 8-17 g/L, pero lo que se encuentra en esta investigación es que estos valores van de 2 a 10 g/L, pero cabe resaltar que se obtuvo una muestra bastante especial que presentó una concentración de 21 g/L; dejando de lado esta muestra, la principal razón por la que se encuentra una diferencia entre lo reportado con anterioridad y lo que se obtuvo en este trabajo, es la metodología seguida en el tratamiento de la muestra, puesto que aquí se llevaron a cabo varias filtraciones, con lo cual se eliminan las microfibrillas que se pueden desprender de la planta cuando se le raspa para obtener el aguamiel. En conclusión, en la presente investigación se cuantificaron solo los azúcares solubles.

Finalmente, considerando que el contenido total de FOS (ver grafica 6.4) totales oscila entre 2-10 g/L para la mayoría de los aguamieles estudiados, sería necesario un consumo mínimo de 1.5 litros por día para tener el aporte necesario del prebiótico (el consumo diario que se sugiere para lograr la estimulación de las bifido-bacterias es de 15 g /día). O bien si se cuenta con un aguamiel tan rico en contenido de FOS, como el de la muestra de Hidalgo IV, se necesita beber poco más de 700 mL de aguamiel.

Tabla 6.13. Resultados para aguamiel grupo 1.

MUESTRA	San Pedro Atocpan	San Bartolo Chicomulco	Tepeapulco	Tulancingo A	Tulancingo B	Coatepec
Nombre	% (p/v)	% (p/v)	% (p/v)	% (p/v)	% (p/v)	% (p/v)
FOS 10	0.13477	0.18102	0.13433	0.14072	0.09987	0.33860
FOS 10'	0.02620	-	0.02347	0.02557	0.01290	-
FOS 9	0.00326	0.04518	-	-	-	0.05123
FOS 9'	0.00313	-	-	-	-	-
FOS 8	0.00587	0.01471	-	-	-	-
FOS 8'	0.00810	0.01811	-	-	-	-
FOS 7	0.01047	0.01375	-	0.19906	0.17141	0.25286
FOS 7'	0.01009	0.01512	0.35566	-	-	-
FOS 6	0.00686	-	0.00631	0.00989	-	-
FOS 6'	-	0.00767	-	-	-	-
FOS 5	0.00390	-	0.02079	0.01984	0.00487	0.00897
FOS 5'	-	-	0.03460	0.06575	0.02191	-
FOS 4	-	-	-	0.01125	-	0.11398
FOS 4'	-	-	0.08769	0.05755	0.01341	-
FOS 3	0.00843	0.00934	0.01625	0.03831	0.03508	0.20666
FOS 3'	-	-	0.02561	0.04391	0.01281	-
Sac	6.96419	6.80607	2.33368	1.47353	4.53945	4.78145
F-F	-	-	0.07944	0.12621	0.07190	0.03937
Glu	1.01937	0.74147	1.61821	1.86621	1.54710	2.40895
Fru	0.07190	0.08783	0.80857	1.69695	1.35907	1.43446
TA						
TA [% p/v]	8.27654	7.94028	5.54465	5.77475	7.88979	9.63653
TF						
TF [% p/v]	0.22108	0.30490	0.78418	0.73806	0.44416	1.01167
% de TF del TA						
% de TF del TA	2.67	3.84	14.14	12.78	5.63	10.50

TA: Total de azúcares, obtenido de la suma de las concentraciones de todos los componentes.

TF: Total de FOS, obtenido al restarle a TA las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa.

***% de TF del TA: Porcentaje que representa el total de FOS del total de azúcares.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 6.14. Resultados para aguamiel grupo 2.

MUESTRA	ACTOPAN A	ACTOPAN B	PACHUCA A	PACHUCA B	HIDALGO IV	MEZITTLAN
Nombre	% (p/v)	% (p/v)	% (p/v)	% (p/v)	% (p/v)	% (p/v)
FOS 10	0.10546	0.15857	0.20958	0.15731	0.40563	0.03601
FOS 10'	-	-	-	-	-	0.03670
FOS 9	0.03030	0.06051	0.07406	0.09221	0.08838	-
FOS 9'	-	-	-	-	-	-
FOS 8	-	-	-	-	-	-
FOS 8'	-	-	0.10116	0.12727	0.01573	-
FOS 7	0.31499	0.20751	-	-	0.03555	0.24311
FOS 7'	-	-	-	-	0.15833	-
FOS 6	-	-	0.01325	-	0.05981	-
FOS 6'	0.00963	-	-	-	0.19643	-
FOS 5	-	0.01117	0.02317	0.01564	-	0.01465
FOS 5'	0.05196	0.07092	0.06531	0.03153	0.24297	0.05144
FOS 4	0.00775	-	-	-	-	-
FOS 4'	0.01505	0.01591	0.03102	0.02478	0.26737	0.10230
FOS 3	0.04091	0.04823	0.09532	0.06052	0.09755	0.03042
FOS 3'	0.00907	0.00769	-	-	0.04763	0.06996
Sac	3.19341	5.17822	7.36987	6.77328	6.16203	4.02164
F-F	0.05799	0.06241	0.07371	0.05922	0.48468	0.07782
Glu	1.14489	1.41106	0.49778	0.41052	2.24930	1.88624
Fru	0.91521	1.04607	0.62139	0.42730	2.70960	1.13177
TA [% p/v]	5.89661	8.27826	9.17560	8.17957	13.22099	7.70206
TF [% p/v]	-0.64310	0.64292	0.68656	0.56847	2.10006	0.66241
% de TF del TA	10.91	7.77	7.48	6.95	15.88	8.60

TA: Total de azúcares, obtenido de la suma de las concentraciones de todos los componentes.

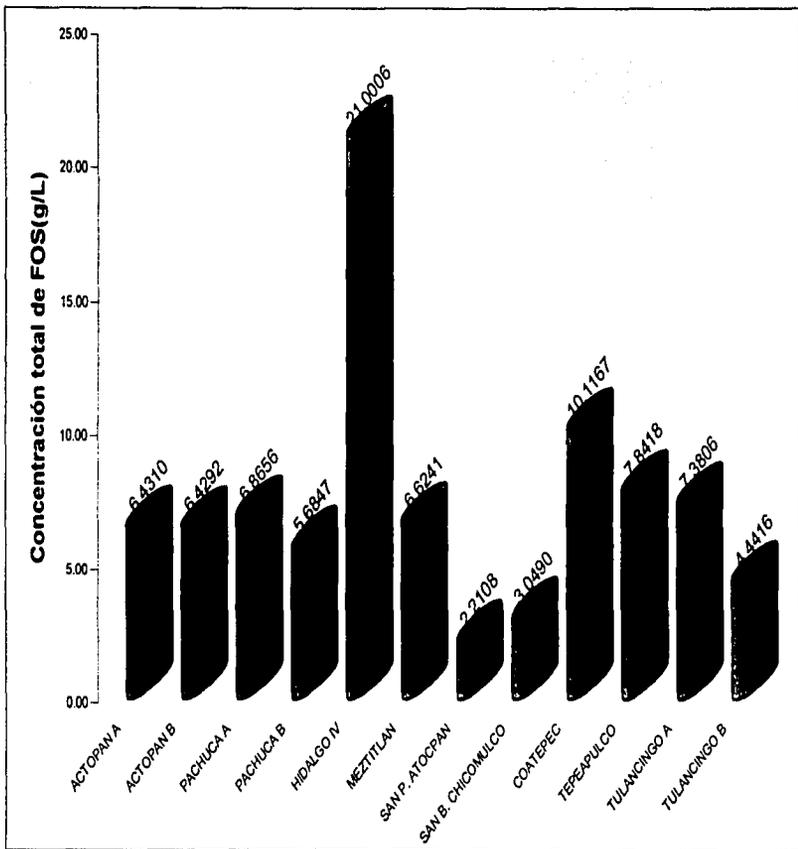
TF: Total de FOS, obtenido al restarle a TA las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa.

***% de TF del TA: Porcentaje que representa el total de FOS del total de azúcares.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

th



Grafica 6.4. Comparación del contenido total de FOS en los aguamiel

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. CONCLUSIONES

- Se estableció la metodología adecuada para trabajar las muestras de aguamieles y patrones empleados en el HPLC
- Se seleccionó la mejor técnica para eliminar la proteína de las muestras de aguamiel, que es el eliminar ésta por ultrafiltración con membranas de corte de 30 kDa. La selección se llevó a cabo al comparar el contenido de proteína residual y ver si la técnica no afectaba el contenido de azúcares.
- Por medio del establecimiento de la metodología para identificar y cuantificar los FOS, se logró la caracterización de los azúcares en los aguamieles.
- Los FOS que mayoritariamente se encontraron son 10, 7, 5, 5', 4', 3 y 3'. El largo de estas cadenas esta dado por la acción de las enzimas endógenas y exógenas que están en el aguamiel. Tales enzimas se tuvo el cuidado de inactivarlas para que así el contenido de FOS reportados fuera lo más cercano posible al que tiene la muestra al momento de su cosecha.
- Con los datos que se tienen se puede decir que el contenido y variedad de FOS está dado probablemente por el clima y tipo de suelo de donde provenga la muestra. Esto se ve muy claro en los aguamieles del estado de Hidalgo.
- La concentración total de FOS en los aguamieles esta entre 2 y 10 g/L, aunque también pueden existir muestras que tengan hasta una concentración de 21 g/L.
- Con las concentraciones encontradas de FOS totales, sería necesario el consumir un mínimo de 1.5 L/día si se consume una muestra que tenga una concentración de 10 g/L o solo 0.7 L/día de una muestra con un contenido de 21 g/L, para tener un efecto benéfico en la salud del consumidor.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ☞ Barros C. y Buenrostro M. (1997a); Del aguamiel al pulque (1ª parte). Cuadernos de Nutrición; 20:4 :4.
- ☞ Barros C. y Buenrostro M. (1997b); Del aguamiel al pulque (2ª parte). Cuadernos de Nutrición, 20:5 :30.
- ☞ Blelecka M., Biedrzycka E. y Majkowska A. (2002); Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. Food Research International; 35: 125-131.
- ☞ Brady L. J., Gallaher D. D. y Busta F. F. (2000); The role of probiotic cultures in prevention of colon cancer. Journal of Nutrition; 130: 410s-414s.
- ☞ Crittenden R. G. y Playne M. J. (1996); Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. Trends in Food Science & Technology; 7: 353-361.
- ☞ Cruz Guerrero A. García Peña I., Barzana E., García Garibay M. y Gómez Ruíz L. (1995); *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A wild inulinase hiperproducing strain. Journal of Fermentation and Bioengineering; 80:2: 159-163.
- ☞ Cho Y. J., Sinha J., Park J. P., Yun J. W. (2001); Production of inulosaccharides from chicory extract by endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No. 5. Enzyme and Microbial Technology; 28: 439-445.
- ☞ Escalante L. A. (2001); El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología; 21(3): 106:114.
- ☞ Folleto Informativo de Frutafit (1998), USA.
- ☞ Fooks L. J. y Gibson G. R. (2002); In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. FEMS Microbiology Ecology; 39: 67-75.
- ☞ Fooks L. J., Fuller R. y Gibson G. R. (1999) Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. International Dairy Journal; 9: 53-61.
- ☞ Fuller R. (1989), Probiotics in man and animals. Journal Of Applied Bacteriology; 66:365-378.

- ☞ Gibson G. R. y Fuller R. (2000); Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *Journal of Nutrition*; 130: 391s-395s.
- ☞ Guigoz Y., Rochat F., Perruisseau-Carrier G., Rochat I. y Schiffrin E. J. (2002); Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. *Nutrition Research*; 22: 13-25.
- ☞ Havenaar R. Huis In't Veld MJH. (1992); Probiotics: a general view. In: *Lactic acid bacteria in health and disease. Vol 1.* Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers; 151-170.
- ☞ Kim D. H., Choi Y. J., Song S. K. y Yun J. W. (1997); Production of inulo-oligosaccharides using endo-inulinase from a *Pseudomonas sp.* *Biotechnology Letters*; 11: 4: 369-371.
- ☞ Losada M. A. y Olleros T. (2002); Towards a healthier diet of colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. *Nutrition Research*; 22: 71-84.
- ☞ Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951); Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*; 193: 265-275.
- ☞ Martínez del Campo M. G. (1999); Determinación, cuantificación e hidrólisis de inulina en el aguamiel de agave pulquero, *Agave atrovirens*. Tesis licenciatura, UNAM, México D.F. pp 9, 11-15, 49-51.
- ☞ Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R. y Saarela M. (2002); Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*; 12: 173-182.
- ☞ Parker R. B. (1974); Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*; 29: 4-8.
- ☞ Rivero M. (2000); Resumen de la videoconferencia sobre alimentos funcionales. Formación continuada de Postgrado a distancia en Nutrición y Salud. Universidad de Navarra, España.
- ☞ Sánchez M. A. y Hope P. H. (1953); Agave juice. Fermentation and chemical composition studies of some species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 1:3: 246-249.

- ☞ Schrezenmeir J. y de Vrese M. (2001); Probiotics, prebiotics, and synbiotics -approaching a definition. *American Journal Clinical Nutrition*; 73:2: 361S-364S.
- ☞ Shue D. C., Lio P. J., Chen S. T., Lin C. T. y Duan K. J. (2001); Production of fructooligosaccharides in high yield using a mixed enzyme system of β -fructofuranosidase and glucose oxidase. *Biotechnology Letters*; 23: 1499-1503.
- ☞ Sperti G. S. (1971); Probiotics. West Point, CT: Avi Publishing Co.
- ☞ Srinivasan M. y Bhatia I. S. (1953); The carbohydrates of *Agave vera cruz* Mill. *Biochemical Journal*; 55: 286-289.
- ☞ Sultana K., Godward G., Reynolds N., Arumugaswamy R., Peiris P. y Kailasapathy K. (2000); Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*. 2000; 62: 47-55.
- ☞ Van Loo J., Cummings J., Delzenne N., Englyst H., Franck A., Hopkins M., Kok N., Macfarlane G., Newton D., Quigley M., Roberfroid M., Van Vliet T. y Van Den Heuvel E. (1999); Functional food properties of non digestible oligosaccharides : a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *British Journal of Nutrition*; 81: 121-132.
- ☞ Yun J. W. (1996); Fructooligosaccharides -Occurrence, preparation and application. *Enzyme and Microbial Technology*; 19: 107-117.
- ☞ Zubillaga M., Weill R., Postaire E., Goldman C., Caro R. y Boccio J. (2001); Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutrition Research*; 21: 569-579.

1. Cuantificación de proteína por la Técnica de Lowry. (Lowry y col., 1951)

• Fundamento

El método de Lowry reconoce los residuos de aminoácidos aromáticos. Se basa en la formación del complejo cobre-proteína que se forma al hacer reaccionar la muestra en una solución de cobre alcalina; posteriormente dicho complejo reduce el reactivo de Folin-Ciocalteu y como resultado aparece un característico color azul cuya absorbancia se mide a una λ de 590 nm.

• Reactivos

- [A] Na_2CO_3 (J. T. Baker, Xalostoc, México) al 2% en NaOH 0.1 N.
- [B] CuSO_4 (J. T. Baker, Xalostoc, México) al 1% en H_2O .
- [C] Tartrato de Na y K (J. T. Baker, Xalostoc, México) al 2% en H_2O .
- [D] Reactivo de Folin Ciocalteu (Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA) 1:1 en agua.
- [E] Solución patrón de albúmina sérica (Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA) 1 mg/mL.

• Técnica

- Se mezclaron 50 volúmenes de [A] más 1 volumen de [B] más 1 de [C].
- Se tomaron 5 mL de esta solución y se les agregó 1 mL de muestra.
- Se dejaron reposar 5 minutos en la oscuridad.
- Se agregaron 0.5 mL de [D].
- Se dejó reposar 30 minutos en la oscuridad.
- Se leyó absorbancia a $\lambda = 590$ nm en espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A), contra un blanco de reactivos y agua destilada.
- La curva patrón se preparó a partir de una solución de 500 mg/mL de seroalbumina, la cual se diluyó (a 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL) para cubrir un intervalo de 0 a 500 mg/mL.

2. Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético al 10%

• Reactivos

- Ácido tricloroacético (J. T. Baker, Xalostoc, México) al 10% en H_2O .

• Técnica

- Se diluyó el aguamiel 1:1 con agua destilada
- A 1 mL de la dilución anterior se le agregó 1 mL de la solución de TCA al 10 %, se agitó
- Se centrifugó (Beckman J2-MI, U.S.A) a una velocidad de 5000 r.p.m. por 25 min a una temperatura de 4°C.

3. Precipitación de proteínas con BaOH 0.3 M y ZnSO₄ 0.3 M

- Reactivos
 - Solución de BaOH 0.3 M (Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA).
 - Solución de ZnSO₄ 0.3 M (Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA).
- Técnica
 - En un tubo de ensaye se colocó 1 mL de muestra y 4 mL de agua destilada.
 - Se tomaron 2 mL del tubo anterior y se agregaron 1 mL de BaOH 0.3 M, se agitó y se agregó 1 mL de ZnSO₄ 0.3 M, se agitó.
 - Se centrifugó a 10000 r.p.m. por 5 min y a una temperatura de 4°C, para separar el precipitado.

4. Ultrafiltración con membrana

- Material
 - Membranas de celulosa (Millipore, U.S.A.) tamaño de poro 0.22 μ m.
 - Membranas de ultrafiltración (Pall, E.U.) corte de 30 kDa.
- Técnica
 - Primero se hizo pasar el aguamiel por la membrana de celulosa con tamaño de poro 0.22 μ m, para quitar microfibras del agave.
 - Del filtrado anterior se tomaron 400 μ L y se colocaron en una membrana de corte 30 kDa.
 - Se centrifugó a una velocidad de 5000 r.p.m. por 25 min a una temperatura de 4°C.

Terminado el centrifugado se midió el volumen que filtro la membrana, para saber si además de eliminar la proteína hubo concentración de la muestra.